

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:
29. April 2004 (29.04.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/035787 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/12,
15/62, 15/63, 5/06, 5/08, 5/10, A01K 67/027, A61K 35/34,
35/39, C07K 14/705, 14/54, 16/46, 16/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/CH2003/000665

(22) Internationales Anmeldedatum:
13. Oktober 2003 (13.10.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
02022868.0 14. Oktober 2002 (14.10.2002) EP

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): F. HOFFMANN-LA ROCHE AG [CH/CH]; Gren-
zacherstrasse 124, CH-4070 Basel (CH).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BURCIN, Mark
[DE/DE]; Mommsenstrasse 18, 40699 Erkrath (DE).
ESSER, Sybille [DE/DE]; Sedentalerstrasse 20,
40699 Erkrath (DE). RUEDIGER, Manfred [DE/DE];
Kitzbuehler Weg 34, 40789 Monheim (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: F. HOFFMANN-LA ROCHE
AG; Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel (CH).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD,
GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 26. August 2004

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: TRANSPLANTABLE CELL WITH IMMUNE MODULATOR

(54) Bezeichnung: TRANSPLANTIERBARE ZELLE MIT IMMUNMODULATOR

(57) Abstract: The invention relates to a human or animal non-totipotent cell which contains at least one nucleic acid which codes for at least one immune modulator by controlling a gene switch molecule which is adjusted by adding an active substance. The invention also relates to the production and use thereof in transplants in order to inhibit transplant rejection and also for the prophylaxis and/or therapy of diseases resulting from a transplant and/or auto immune diseases.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine humane oder tierische nicht-totipotente Zelle, die mindestens eine Nukleinsäure enthält, welche für mindestens einen Immunmodulator unter der Kontrolle eines durch Zugabe einer Wirksubstanz regulierbaren Genschaltermoleküls kodiert sowie ihre Herstellung und Verwendung zur Transplantation, zur Inhibierung einer Transplantationsabstoßungsreaktion sowie zur Prophylaxe und/oder Therapie von Transplantationsfolge- und/oder Autoimmunkrankheiten.

WO 2004/035787 A3

Transplantierbare Zelle

Die Erfindung betrifft eine humane oder tierische nicht-totipotente Zelle, die
5 mindestens eine Nukleinsäure enthält, welche für mindestens einen
Immunmodulator unter der Kontrolle eines durch Zugabe einer Wirksubstanz
regulierbaren Genschaltermoleküls kodiert sowie ihre Herstellung und
Verwendung zur Transplantation, zur Inhibierung einer
Transplantationsabstoßungsreaktion sowie zur Prophylaxe und/oder Therapie von
10 Transplantationsfolge- und/oder Autoimmunkrankheiten.

Eine Vielzahl von menschlichen Erkrankungen beruhen auf dem Absterben oder
der Fehlfunktion von spezifischen Zellen, Geweben oder Organen und kann
medikamentös oft nur unzureichend behandelt werden. Die konventionelle
15 Therapie bestand bisher darin, das geschädigte Gewebe oder Organ durch
Transplantation von gesunden Zellen, Geweben oder Organen, wie z.B. Herz,
Lunge, Niere, Pankreas oder Zellen bzw. Gewebe hieraus zu ersetzen, die von
gesunden menschlichen Spendern erhalten wurden. Aufgrund der bestehenden
Knappheit an Organspendern kann der Bedarf an Spendergewebe jedoch nur
20 unzureichend gedeckt werden. Dieser Mangel könnte durch die Transplantation
von Geweben bzw. Zellen aus speziell gezüchteten nicht-humanen Spender-
Säugetieren behoben werden. Alternativ können Ersatzzellen auch aus Zelllinien
gewonnen werden. Diese Zellen können ebenfalls humanen oder nicht-humanen
Ursprunges sein.

25

Bei jeder Transplantation von nicht-humanen Zellen, Geweben oder Organen in
einen humanen Organismus (Xenotransplantation) bzw. von humanen
Spenderzellen, Spendergewebe oder Spenderorganen eines genetisch nicht-
identischen Menschen in einen humanen Empfänger (Allotransplantation) besteht
30 jedoch das Problem der immunvermittelten Transplantatabstoßung. Die

Abstoßung basiert auf der Erkennung der auf den Spenderzellen vorhandenen Histokompatibilitätsantigene als Fremdproteine, wodurch eine gegen das Transplantat gerichtete Immunantwort ausgelöst wird. Die Immunantwort gegen allogene und xenogene Zellen, Gewebe und Organe beruht auf zahlreichen komplexen Wechselwirkungen zwischen unterschiedlichen Zellen (z.B. B-Zellen, T-Zellen, Antigen präsentierenden Zellen) des Immunsystems und kann letztlich zur Abstoßung der/des übertragenen Zellen, Gewebes oder Organs führen. Zur Unterdrückung der Immunreaktionen muss der Empfänger daher mit Medikamenten, sogenannten Immunmodulatoren, behandelt werden, die das Immunsystem unterdrücken oder eine Toleranz des Empfängers gegenüber dem Transplantat bewirken und somit eine solche Abstoßungsreaktion verhindern.

Als Immunmodulatoren werden z.B. Steroide (Prednisolon und Derivate), Calcineurininhibitoren (Cyclosporin A, Tacrolimus), Rapamycin (Sirolimus), Mycophenolat Mofetil (MMF), Azathioprin (Imuran), Lymphocyten-Antiseren (ALG – anti-Leukocyte-Globulin, ATG – anti Thymocyte Globulin) oder monoklonale Antikörper (anti-CD25: Zenapax, Simulect) verwendet.

Während Antikörpertherapien als unterstützende Therapien während der ersten Wochen und Monate nach der Transplantation verabreicht werden (Induktionstherapie), werden die Calcineurininhibitoren, Steroide und oft MMF oder Imuran in der Regel vom Zeitpunkt der Transplantation an über den gesamten Zeitraum, in dem der Patient das Transplantat trägt, d.h. teilweise lebenslang, administriert. Unabhängig von der Art, Wirkungsweise und Kombination der derzeit verwendeten immunmodulatorischen Substanzen werden die Medikamente jedoch zumeist intravenös oder oral verabreicht und damit über den gesamten Körper des Patienten verteilt. Damit gelangen sie nicht nur an ihren Wirkungsort, d.h., in das transplantierte Organ oder Gewebe, oder den Ort an dem die transplantierten Zellen anwachsen, sondern auch in alle anderen Gewebe und Organe des Organismus. Dies führt zu einer generellen Unterdrückung der Immunabwehr, die nicht auf das Transplantat begrenzt ist. In den zielfremden

Gewebe und Organen beeinträchtigen sie die Funktion des Immunsystems und verhindern damit die physiologische Funktionsweise vieler Organe, was zu zahlreichen Nebenwirkungen führen kann.

Zu den bedeutendsten Nebenwirkungen konventioneller Immunmodulatortherapie
5 zählen dabei Bluthochdruck, Nieren- und Leberschäden, das vermehrte Auftreten
von opportunistischen Infektionen und eine erhöhte Rate von verschiedenen malignen
Entartungen wie z.B. Krebs und lymphoproliferative Erkrankungen. So kann z.B. die
Infektion mit dem Cytomegalievirus, die normalerweise nur mit geringen
Symptomen verläuft, in immunsupprimierten Patienten zur Ausbildung von
10 Hepatitis, Lungen- und Hirnhautentzündungen führen und ist damit eine
Hauptursache für die erhöhte Sterblichkeitsrate von Transplantatempfängern
(Transplantation Clinical Management, Vol. 5, 2000 Medscape, Inc., Web MD
Health Network, NY, USA). Andere Studien belegen, dass immunsupprimierte
Allograft-Empfänger nach konventioneller Behandlung ein drei- bis vierfach
15 erhöhtes Krebsrisiko haben, welches bei bestimmten Krebsarten sogar um den Faktor
20-500 ansteigen kann (Penn I., Clin. Transpl. 147-158, 1998). Zusätzlich können
Immunmodulatoren, insbesondere Immunsuppressiva, unabhängig von ihrer
Wirkung auf das Immunsystem generell toxische Eigenschaften aufweisen. So
verursachen Calcineurininhibitoren oftmals Niereninsuffizienz, Bluthochdruck,
20 Hyperlipidämie und die Entwicklung eines Diabetes mellitus. Weiterhin führt die
regelmäßige Medikamentenbehandlung zu einer starken Beeinträchtigung der
Lebensqualität und wird daher oftmals von den Patienten nicht in dem medizinisch
notwendigen Ausmaß durchgeführt.

25 Weiterer Nachteil ist, dass die Medikamente in relativ hoher Dosierung verabreicht
werden müssen, damit sie nach Verteilung über den gesamten Blutkreislauf noch die
therapeutische Wirkkonzentration am Transplantationsort erreichen. Hierdurch wird
das Auftreten der genannten Nebenwirkungen noch begünstigt bzw. verstärkt.

Um diesen Tatsachen entgegenzuwirken, wurden in den letzten Jahren zahlreiche neuartige immuntherapeutische und begleitende diagnostische Ansätze entwickelt.

Ein klinisch erprobter Ansatz zur Reduktion der Nebenwirkungen der Immunmodulation besteht z.B. darin, neuentwickelte immunreaktive Medikamente
5 in niedrigen Konzentrationen zu kombinieren und damit Standardtherapeutika (z.B. Steroide, Cyclosporin A) zu ersetzen. Dies wurde z.B. erfolgreich bei der Transplantation von allogenen Inselzellen zur Behandlung des Diabetes mellitus durchgeführt, bei der die diabetogene Wirkung von Glucokortikoiden durch die Verwendung einer Kombination aus Daclizumab, Sirolimus und niedrigdosiertem
10 Tacrolimus umgangen wurde (Shapiro J., The New England Journal of Medicine, Vol 343, N. 4, 230-238, 2000). Die Nebenwirkungen der einzelnen Immunmodulatoren dieser Kombination wie z.B. das Absinken des Leukozytenspiegels, das Auftreten von Mundabszessen und Verdauungsstörungen, konnten jedoch auch bei dieser Behandlung nicht vermieden werden.

15

Ein weiterer Therapieansatz könnte darin bestehen, im Patienten durch Verabreichung neuartiger immunmodulatorischer Substanzen eine immunologische Toleranz gegenüber dem Fremdgewebe zu erreichen. Toleranz ist in diesem Zusammenhang als die fehlende Immunantwort bzw. Abstoßungsreaktion gegen das
20 Transplantat ohne fortwährende Immunsuppression charakterisiert. Die Verabreichung solcher immunmodulatorischen Substanzen erfolgt nach den üblichen, dem Fachmann bekannten, Methoden (siehe z.B. WO 00/12138; WO 97/41232; WO 96/26274; WO 01/87330; Ferrari-Lacraz et al., The Journal of Immunology, 2001, Vol.167 S. 3478-3485; Kim et al., The Journal of Immunology,
25 1998, 160: 5742-5748; Penn, Transplant Proc, 1991, 23:1101; Beveridge et al., Lancet, 1984, 1:788).

- 5 -

Ein Nachteil des herkömmlichen Therapieansatzes ist, dass auch Toleranz induzierende Immunomodulatoren im Normalfall systemisch (z.B. intravenös) administriert werden. Ein weiterer Nachteil ist, dass die Immunomodulatoren als therapeutische Produkte aus natürlichen Quellen isoliert oder als rekombinante Moleküle biotechnologisch hergestellt werden müssen, um sie dann dem Patienten von extern zu verabreichen. Produktionsbedingte Aspekte können jedoch dazu führen, dass ein Immunmodulator in nativer Form oder als rekombinantes Molekül nicht in ausreichender Menge bzw. Aktivität isoliert oder hergestellt werden kann. Zusätzlich kann die ex vivo Produktion des Immunmodulators die Zugabe von Substanzen erforderlich machen, die ein weiteres gesundheitliches Risiko für den Patienten bedeuten können (z.B. Substanzen, die aus tierischen Organismen isoliert wurden und daher potentiell Zoonosen übertragen können). Dies kann zur Folge haben, dass nicht alle Patienten in ausreichender Weise mit dem Immunmodulator behandelt werden können oder dass die Behandlung mit zusätzlichen gesundheitlichen Risiken verbunden ist.

Im Rahmen der Erfindung wurde die Aufgabe gestellt, eine Immuntherapie zu entwickeln, die die oben beschriebenen Nachteile vermeidet bzw. verringert, insbesondere, die ihre immunmodulatorische, insbesondere immunsuppressive, Wirkung im Organismus genau dort entfaltet, wo die Immunantwort aktiviert wurde bzw. aktivierbar ist, d.h. am Lokalisationsort der transplantierten Zellen oder Organe, und gleichzeitig eine zeitlich und mengenmäßig regulierbare immunmodulatorische Wirkung ermöglicht.

Erfindungsgemäß wurde eine kontrollierbare Expression des Immunmodulators in Zellen mit Hilfe eines regulierbaren Genexpressionssystems erreicht.

Mit Hilfe dieses regulierbaren Genexpressionssystems ist es möglich, einen Immunmodulator lokal (z.B. in Zelltransplantaten) und dosiert zu produzieren.

Eine solche regulierbare Produktion von Immunmodulatoren konnte bisher nicht gezeigt werden. Umso überraschender war der Befund, in transienten Zellkulturversuchen eine regulierbare Produktion des Immunmodulators MutIL-15/mFc zu erhalten (siehe Beispiel 1 und Kim et al., I. Immunology 1998, 160, 5742-5748).

Dieses regulierbare Expressionssystem ermöglicht es, dass Immunmodulatoren gar nicht mehr oder nur noch in geringen Konzentrationen kontinuierlich systemisch verabreicht werden müssen.

Ein weiterer erheblicher Vorteil der Erfindung liegt darin, dass auch an dem Lokalisationsort des Transplantats keine anhaltende Suppression der Immunantwort erfolgen muss, wenn dies aus medizinischer Sicht nicht erforderlich ist, sondern diese nur bei Bedarf aktiviert wird. Dadurch werden Nebenwirkungen sowie eine Belastung des Körpers, insbesondere der Transplantatregion, reduziert. Auch für den Patienten bedeutet dies eine physische und psychische Entlastung, da er nicht kontinuierlich auf die Verabreichung von Immunmodulatoren, insbesondere Immunsuppressiva, angewiesen ist. Unter Immunsuppressiva in diesem Sinne sind Substanzen zu verstehen, die eine Immunantwort, hervorgerufen durch das Transplantat, insbesondere Zelle(n), Gewebe und/oder Organ(e), in dem Organismus ganz oder teilweise inhibieren.

Zusätzlich liefert diese Erfindung den Vorteil, dass der Immunmodulator nicht mehr aus einer nativen Quelle isoliert oder rekombinant hergestellt und aufgereinigt werden muss. Der Immunmodulator wird in therapeutisch aktiver Menge und Form im Empfängerorganismus und/oder am Wirkort in vivo gebildet und behält somit seine volle native Aktivität.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft daher eine transplantierbare humane oder tierische nicht-totipotente Zelle, die mindestens eine Nukleinsäure enthält, die für mindestens einen Immunmodulator unter der Kontrolle eines durch Zugabe einer Wirksubstanz regulierbaren Genexpressionssystems kodiert.

Unter einer Nukleinsäure im Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man eine RNA oder DNA, insbesondere genomische DNA, rekombinant hergestellte DNA, cDNA oder synthetische DNA, die beispielsweise auf Phosphoramidierungsebene synthetisiert wurde. Ebenfalls sind Kombinationen und/oder Modifikationen von Nukleotiden dieser Nukleinsäuren umfasst. Weiterhin umfasst dieser Begriff
5 einzel- und doppelsträngige Nukleinsäuren.

Ebenso umfasst sind Nukleinsäuren, die funktionell verknüpfte Komponenten beinhalten, beispielsweise ein oder mehrere Gene oder aktive Teile davon
10 kodierend für einen oder mehrere Immunmodulatoren sowie mindestens ein regulierbares Genexpressionssystem, dessen Aktivierungszustand durch Zugabe einer Wirksubstanz reguliert wird, sowie regulierbare Elemente, beispielsweise Promotoren und regulative Nukleotidsequenzen sowie ein Polyadenylierungssignal, beispielsweise ein SV40-Polyadenylierungssignal. Die
15 Komponenten sind funktionell verknüpft, wenn sie derart verbunden sind, dass unter dem Einfluss der Transkriptionsregulation die Sequenz(en) der enthaltenen Gene bzw. des Gens transkribiert werden bzw. wird.

Der Begriff Immunmodulator der vorliegenden Erfindung umfasst im wesentlichen jede Art von Molekül, das immunmodulatorische, insbesondere
20 immunsupprimierende, Wirkung aufweist, beispielsweise Proteine, Fusionsproteine und lösliche Liganden, wobei unter einem Fusionsprotein ein Expressionsprodukt eines fusionierten Gens zu verstehen, das aus der Verknüpfung zweier oder mehrerer Gene oder Genfragmente entsteht.

25

Eine immunmodulierende Wirkung liegt vor, wenn die Immunantwort eines Organismus, einer Zelle und/oder eines Gewebes im Wesentlichen inhibiert wird, beispielsweise durch eine veränderte oder unterdrückte Rezeptorbindung. Eine immunmodulierende Wirkung liegt ebenfalls vor, wenn eine immunologische
30 Toleranz gegenüber einer/s transplantierten Zelle, Gewebe oder Organs bewirkt wird.

Die Wirkung des Immunmodulators umfasst beispielsweise eine oder mehrere der folgenden Aktivitäten:

- die Inhibierung einer durch T-Zellen vermittelten Antigenerkennung,
- 5 · die Inhibierung eines über einen Rezeptor auf einer T-Zelle vermittelten Signals,
- die Aktivierung eines über einen Rezeptor auf einer T-Zelle vermittelten Signals,
- die Inhibierung des Wachstums von T-Zellen,
- 10 · die Inhibierung von Molekülen die das Überleben von T-Zellen unterstützen
- die Inhibierung von Effektormolekülen von T-Zellen(wie TNF-alpha, IFN-gamma),
- die Inhibierung der Adhäsion von T-Zellen,
- die Inhibierung einer T-Zell-kostimulatorischen Interaktion (die Aktivierung
15 eines Lymphozyten erfolgt über zwei Signale: zum einen erfolgt eine Stimulierung über den Antigenrezeptor, zum anderen erfolgt ein weiteres Signal zur klonalen Expansion und Differenzierung eines ungeprägten Lymphozyten; diese kostimulatorische Interaktion kann durch einen Immunmodulator inhibiert werden)
- 20 · die Inhibierung der Aktivierung, der Proliferation, des Überlebens, der Antigenpräsentation, des Signalisierens, und/oder der Effektorfunktionen von weiteren Zellen, die an einer Immunantwort beteiligt sind, wie z.B. allgemeine und spezielle antigenpräsentierende Zellen, insbesondere z.B. dendritische Zellen und Monozyten/Makrophagen B-Zellen, neutrophile Granulozyten und
- 25 NK Zellen die Inhibierung der zellulären Interaktion von unterschiedlichen Zellen, entweder über Oberflächenrezeptoren oder über sekretierte Moleküle, wie z.B. Zytokine, Chemokine oder Wachstumsfaktoren, die an einer Immunantwort beteiligt sind, wie z.B. allgemeine und spezielle

antigenpräsentierende Zellen, insbesondere z.B. dendritische Zellen und Monozyten/Makrophagen, T-Zellen, B-Zellen, neutrophile Granulozyten und NK Zellen,

- die Inhibierung der Migration von Zellen, die an einer Immunantwort beteiligt sind, wie z.B. spezielle antigenpräsentierende Zellen, insbesondere z.B. dendritische Zellen und Monozyten/Makrophagen, T-Zellen, B-Zellen, neutrophile Granulozyten und NK Zellen,
- die Inhibierung von Komponenten des Komplementsystems
- die Inhibierung von phagozytotischen Aktivitäten im Zusammenhang mit der Präsentation von Fremd- oder Autoimmunantigenen, oder durch die Bindung von Antikörpern an Antigene, und/oder
- die Inhibierung von Entzündungsreaktionen.

Als Immunmodulatoren eignen sich beispielsweise Antikörper. Besonders bevorzugt handelt es sich um einen Antikörper gegen IL-15, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-12, IL-17, IL-18, IL-21, Interferon gamma, TNF-alpha, CD2, CD3, CD4, CD8, CD28, CD40, CD80, CD86 oder CD154 oder gegen deren Rezeptoren.

Ebenfalls bevorzugt Immunmodulatoren sind FasL, PD-L1 oder PD-L2.

20

Weitere bevorzugte Immunmodulatoren sind IL-15, IL-10, IL-4, IL-2, Interferon gamma oder TGF-beta, insbesondere als Fusionsprotein. Besonders bevorzugt umfasst das Fusionsprotein einerseits Wildtyp-IL-15, Wildtyp-IL-10, Wildtyp-IL-4, Wildtyp-Interferon gamma oder Wildtyp-TGF-beta und andererseits einem Fc-Fragment. Weiterhin besonders bevorzugt umfasst das Fusionsprotein einerseits mutierte IL-15, bevorzugt solche, bei denen an Position 101 und 108 „Q“ durch „D“ ersetzt worden ist oder mutiertes IL-2 und andererseits ein Fc-Fragment (siehe beispielsweise WO 97/41232; Kim et al., J Immunol. (1998),

160(12):5742-5748; WO 01/87330), das beispielsweise an den C-terminus des mutierten IL-15 Molekül über die Hinge-Region fusioniert ist.

Weitere bevorzugte Immunmodulatoren sind Fusionsproteine aus einerseits TNF-alpha-Rezeptor (Typ 1 oder 2), ICOS, CTLA-4, PSGL-1, ICAM-1 oder VCAM-1
5 und andererseits einem Fc-Fragment, wie beispielsweise im Fall der TNF-Rezeptor Fusionsproteine, solche die in EP 417,563 A offenbart sind.

Weitere bevorzugte Immunomodulatoren sind sekretierte Varianten von Zytokin-
10 oder Wachstumsfaktorrezeptoren, wie z.B. IL-15Ralpha, IL-6, IL-7, IL-12, IL-17, IL-18 Rezeptoren, beispielsweise als Varianten ohne Transmembrandomäne und zytoplasmatischem Schwanz, vorzugsweise als Fusionsprotein mit einem Fc-Fragment.

15 Vorzugsweise ist das Fusionsprotein ein chimäres Fusionsprotein. Geeignete Fusionsproteine sind beispielsweise IL-15 Derivate, umfassend IL-15 oder mutiertes IL-15 und ein heterologes Fc-Fragment.

Unter einem Fc(Fragment crystallizable)-Fragment ist das Fragment eines
20 Antikörpers zu verstehen, das keine Antigene bindet, beispielsweise ein solches, das alle konstanten Domänen oder alle konstanten Domänen ausser der ersten konstanten (teilweise oder vollständig) Domäne umfasst, wie z.B. ein solches, das die Hinge-Region, die zweite (CH2) und dritte konstante (CH3) Domäne der schweren Kette umfasst. Das Fc-Fragment kann aus natürlicher Quelle stammen,
25 rekombinant hergestellt werden und/oder synthetisiert werden. Entsprechende Methoden sind dem Fachmann bekannt. Dabei kann das Fc-Fragment auch eine oder mehrere Mutationen gegenüber der natürlichen Sequenz aufweisen, beispielsweise solche, die eine geeignete Schnittstelle für die Konstruktion eines Fusionsproteins beinhalten (siehe Kim et al. supra).

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist das Fc-Fragment ein solches von einem Immunglobulin (Ig)G, insbesondere ein humanes IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 und/oder ein analoges Säugetier IgG und/oder ein IgGM, insbesondere ein humanes IgM oder ein analoges Säugetier IgM und/oder ein murines IgG2a.

5

Die Immunmodulatoren können Wildtyp-Sequenzen oder auch mutierte Sequenzen aufweisen. Vorzugsweise liegen die Immunmodulatoren bereits in einer funktionell aktiven Form vor, beispielsweise in einer funktionell aktiven löslichen Form oder einer funktionell aktiven viralen Form. Unter einer löslichen
10 Form ist ein Molekül zu verstehen, das nicht an eine Zellmembran gebunden ist, wie z.B. ein lösliches Rezeptormolekül. Unter einer viralen Form ist eine Proteinisoform zu verstehen, die endogen von einem Virusgenom kodiert wird, wie z.B. virales IL-10.

15 Unter einer mutierten Sequenz gemäß der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenz zu verstehen, die Abweichungen zur Wildtyp-Sequenz durch beispielsweise Deletion, Addition, Insertion oder Substitution einer oder mehrerer Nukleotide bzw. Aminosäuren enthält, ohne jedoch die immunmodulatorische Wirkung vollständig zu verlieren.

20

Mutierte Immunmodulatoren im Sinne der vorliegenden Erfindung sind daher Moleküle, die vorzugsweise eine Sequenzhomologie von mindestens ungefähr 80%, vorzugsweise mindestens ungefähr 90%, besonders bevorzugt mindestens ungefähr 95%, am meisten bevorzugt mindestens ungefähr 99% der Sequenz zu
25 der Wildtyp-Sequenz aufweisen.

Unter Sequenzhomologie im Sinne der vorliegenden Erfindung wird der Grad der Ähnlichkeit (% Positive) von zwei Sequenzen verstanden, die bei Polynukleotiden beispielsweise mit Hilfe von BLASTN 2.0.14 bestimmt wird, wobei der Filter=off
30 gesetzt ist und BLOSUM 62 ist (Altschul et al. 1997, Nucl. Acids Res., 25: 3389-3402). Die Sequenzhomologie kann mit gängigen Sequenzhomologie-

Programmen z. B. im Internet unter <http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/SearchLauncher/> überprüft werden.

Unter dem Begriff regulierbares Genexpressionssystem im Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man die Kombination aus einer Sequenz kodierend für ein Genschaltermolekül und eine Genschalterbindesequenz, wobei die Bindung des Genschaltermoleküls an die Genschalterbindesequenz durch die Zugabe einer Wirksubstanz reguliert wird, wodurch eine Kontrolle der Expression eines Zielgens, hier ein Zielgen kodierend für einen Immunmodulator, erfolgt (siehe auch Burcin et al. 1998, Frontiers in Bioscience 3: c1-7).

Generell ist es möglich, dass ein Genschaltermolekül durch Bindung an eine geeignete Genschalterbindesequenz die Transkription des Zielgens aktivieren oder inhibieren kann. Die Aktivierung kann darauf beruhen, dass das Genschaltermolekül z.B. Kontaktstellen für die RNA-Polymerase und/oder beteiligte Transkriptionsfaktoren zur Verfügung stellt. Die Inhibierung kann dadurch bewirkt werden, dass das Genschaltermolekül die für den Transkriptionskomplex erforderlichen DNA-Bindungsstellen durch seine Bindung an die DNA blockiert und dadurch unzugänglich für beispielsweise die RNA-Polymerase und/oder beteiligte Transkriptionsfaktoren macht.

Die Zugabe einer Wirksubstanz kann die Transkription des Zielgens positiv (Aktivierung) oder negativ (Inhibierung) beeinflussen. Beispielsweise wird das Zielgen in Abwesenheit der Wirksubstanz nicht exprimiert. Nach Zugabe der Wirksubstanz bindet diese an das Genschaltermolekül und verursacht dadurch die Aktivierung und Bindung des Genschaltermoleküls an die Genschalterbindesequenz, wodurch nachfolgend die Transkription des Zielgens initiiert wird. Ein weiteres Beispiel ist, dass das Genschaltermolekül in Abwesenheit der Wirksubstanz an die DNA bindet und die Transkription aktiviert. Nach Zugabe und Bindung der Wirksubstanz wird das Genschaltermolekül inaktiviert und die Transkription des Zielgens wird beendet.

Unter dem Begriff Genschaltermolekül versteht man ein Molekül, vorzugsweise ein Protein, insbesondere ein Fusionsprotein, enthaltend eine Bindungsstelle für eine Wirksubstanz und eine Transkriptionsaktivierungsdomäne, das nach Bindung der Wirksubstanz seinen Aktivierungszustand verändert.

- 5 Unter dem Begriff Genschalterbindesequenz im Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man vorzugsweise eine 5'-stromaufwärts vom Translationsstart (+1) des Gens, oder aktiven Teiles hiervon, welches für einen Immunmodulator kodiert, gelegene Nukleinsäuresequenz, welche die Transkription des Zielgens, insbesondere bezüglich der Transkriptionsrate und/oder der Gewebespezifität,
10 kontrolliert oder die Translation kontrolliert. An diese Genschalterbindesequenz ist mittelbar oder unmittelbar eine regulatorische Nukleinsäuresequenz mit Promotoraktivität, vorzugsweise ebenfalls mit Enhanceraktivität gebunden.

Die Funktionsweise des erfindungsgemäßen regulierbaren Genexpressionssystems kann beispielsweise wie folgt beschrieben werden:

- 15 Wenn kein Genschaltermolekül an die Genschalterbindesequenz gebunden ist, erfolgt keine Expression des gekoppelten Zielgens und in diesem Fall wird kein Immunmodulator produziert.

- Bei Zugabe einer Wirksubstanz bindet diese beispielsweise an die Dimerisierungsdomäne des Genschaltermoleküls. Durch diese Bindung entsteht
20 eine Konformationsänderung der Dimerisierungsdomäne, die eine Dimerisierung zweier Genschaltermoleküle und die nachfolgende Bindung an die Genschalterbindesequenz bewirkt. Durch diese Bindung wird die Aktivierungsdomäne des Genschaltermoleküls in die Nähe des minimalen TATA Promotors gebracht und somit die Transkription des gekoppelten Zielgenes
25 kodierend für einen Immunmodulator initiiert. Nach beendeter Zugabe der Wirksubstanz wird die Bindung des Genschaltermoleküls an die Genschalterbindesequenz gelöst und somit die Zielgenexpression beendet.

Das Genschaltermolekül der vorliegenden Erfindung ist demnach durch Zugabe einer Wirksubstanz regulierbar, z.B. inhibierbar oder aktivierbar, bevorzugt aktivierbar und bindet dann an die Genschalterbindungsstelle.

- 5 Unter bevorzugter Wirksubstanz ist eine pharmakologisch verträgliche Substanz zu verstehen, die unmittelbar oder mittelbar die regulierte Expression eines Gens oder mehrerer Gene über dessen/deren Genschalter(s) bewirkt, beispielsweise Mifepriston, Tetracyclin, Doxycyclin oder Rapamycin.
- 10 Das regulierte Genexpressionssystem der vorliegenden Erfindung ist insbesondere ein Progesteron-Genexpressionssystem, welches einen Genschalter umfasst, der einen artifiziell zusammengesetzten Transkriptionsfaktor darstellt, bestehend aus einer GAL4-DNA-Bindedomäne (Gal4-DBD), einer Dimerisierungsdomäne, abgeleitet von einem mutierten Progesteronrezeptor mit verkürzter
- 15 Ligandenbindungsstelle (hPR-LBD), und einer Aktivierungsdomäne der p65-Untereinheit des humanen NF- κ B Proteins (p65-AD). Die Genschalterbindesequenz ist eine Nukleotidsequenz bestehend beispielsweise aus einer 17-Nukleotid langen GAL4-Bindungssequenz mit anschließenden minimalen TATA Promotor, an den das entsprechende Zielgen gekoppelt wird.
- 20 Ein solches regulierbares Genexpressionssystem mit den genannten Genschalterkomponenten Gal4-DBD/hPR-LBD/p65-AD ist beispielsweise in Wang et al. 1994, PNAS 91:8180-8184 oder Wang et al. 1997, Gene Therapy 4: 432-441 beschrieben. Die in diesem System geeignete Wirksubstanz ist beispielsweise Mifepriston, ein artifizielles, nicht im Säugetier vorkommendes
- 25 hormonähnliches Molekül, das spezifisch an die Dimerisierungsdomäne des Genschaltermoleküls bindet und diesen durch die dadurch bewirkte Dimerisierung aktiviert.

- Ein weiteres regulierbares Genexpressionssystem der vorliegenden Erfindung ist
- 30 ein Tetracyclin-Genexpressionssystem, das ein durch Tetracyclin (Tet) oder das

Derivat Doxycyclin (Dox) induzierbares System darstellt, bei dem das Genschaltermolekül aus einem Tet Transaktivatorprotein besteht. Dieser Transaktivator (tTA) ist ein Fusionsprotein aus einer VP16 Aktivierungsdomäne und dem Tet Repressor (TetR) von *Escherichia coli*. In Abwesenheit von Tetracyclin hat der tTA eine hohe Affinität zu seiner Genschalterbindestelle, dem Tet-responsiven Element (TRE), und aktiviert die Expression des Zielgens. Bei Zugabe der Wirksubstanz Tetracyclin wird die DNA-Bindung und somit die Zielgenaktivierung inhibiert. Dieses regulierbare Genexpressionssystem wird beispielsweise in Gossen 1995, Science 268: 1766-1769; Fruh 1995, Nature 375:415-418; Chao et al. 1998, Mol. Cell. Biol. 18 (8): 4883-4898; Halappanavar et al. 1999, J. Biol. Chem. 274 (52): 37097-37104 oder van der Vlag et al. 2000, J. Biol. Chem. 275 (1): 697-704 beschrieben.

Eine Modifikation dieses regulatorischen Tet Systems ist der reverse Transaktivator (rtTA). In diesem System ist der Wildtyp TetR durch einen mutierten TetR (rTetR) ersetzt, wodurch das Fusionsprotein die Genschalterbindestelle der DNA nur in Anwesenheit von Doxycyclin bindet und somit gekoppelte Zielgene induziert, wie beispielsweise in Gossen 1995, Science 268: 1766-1769; Gossen et al. 1992, PNAS 89: 5547-5551; Linstedt et al. 1997, Mol. Biol. Cell 8: 1073-1087; Mehlen et al. 1998, Nature 395: 801-804 oder Joosse et al. 2000, Hum. Mol. Genet. 9: 3075-3082 beschrieben.

Ein weiteres regulierbares Genexpressionssystem der vorliegenden Erfindung ist ein Rapamycin-Genexpressionssystem. Hierbei handelt es sich um eine durch die Wirksubstanz Rapamycin vermittelte induzierbare Dimerisierung der Proteine FKBP12 und FRAP. Eine Dimerisierung dieser beiden Proteine bewirkt eine DNA-Bindung der an FRAP gebundenen Aktivierungsdomäne und somit das Anschalten eines gekoppelten Zielgenes. Ein solches regulierbares Genexpressionssystem wird beispielsweise in Rivera et al. 1996, Nature Med 2: 1028-1032 beschrieben.

Die Verabreichung dieser Wirksubstanz kann nach dem Fachmann geläufigen Methoden erfolgen, beispielsweise intravenös, intraperitoneal, intramuskulär, subkutan, intrakranial, intraorbital, intrakapsulär, intraspinal, transmuskulär, topikal, oral oder über die Schleimhaut-Membran, z.B. die Nase oder die Mundhöhle. Weitere Methoden der Verabreichung sind beispielsweise die systemische oder lokale Injektion, die Perfusion oder die Katheter-basierte Verabreichung. Als orale Darreichungsform eignen sich z.B. Tabletten oder Kapseln. Eine Verabreichung über die Lunge erfolgt beispielsweise mit Hilfe von Sprays und über die Haut in Form von Dispositoren, die unter die Haut implantiert werden. Transdermal-therapeutische Systeme (TTS) sind z.B. aus EP 0 944 398-A1, EP 0 916 336-A1, EP 0 889 723-A1 oder EP 0 852 493-A1 bekannt.

Vorzugsweise sind die Zellen transplantierbar. Transplantierbar im Sinne der vorliegenden Erfindung bedeutet, dass die lebende Zelle an eine andere Stelle desselben Organismus oder in einen anderen (Empfänger-)Organismus übertragbar ist, wobei es sich vorzugsweise um eine nicht-tumorigene Zelle handelt, bzw. sofern es sich um eine von einer Tumorzelle abstammende Zelle handelt, diese vor der Transplantation entsprechend behandelt wird (z.B. durch mitotische Inaktivierung), um ihre Proliferation zu inhibieren (siehe z.B. WO 00/64459 und US 5,175,103; Pleasure et al. (1992), The Journal of Neuroscience, 12(5): 1802-1815“.

Die erfindungsgemäße transplantierbare humane oder tierische nicht-totipotente Zelle ist insbesondere eine Säugetierzelle, inklusive einer humanen Zelle, und stammt beispielsweise aus einem Menschen, einer Maus, einer Ratte, einem Meerschweinchen, einem Kaninchen, einer Kuh, einem Schaf, einer Ziege, einem Pferd, einem Schwein, einem Hund, einer Katze oder einem Affen, vorzugsweise aus einem Menschen.

Erfindungsgemäße Zellen sind beispielsweise Epithelzellen, Endothelzellen, Leberzellen, Herzzellen, Hautzellen, Muskelzellen, Nervenzellen, Knochenmarkszellen, Knochenzellen, Knorpelzellen, Blutzellen, Bindegewebszellen und Zellen aus der Bauchspeicheldrüse, der Niere, dem Auge
5 oder der Lunge.

Unter einer nicht-totipotenten Zelle versteht man eine Zelle, die sich nicht selbständig zu seinem vollständigen Organismus zu entwickeln vermag.

10 In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei der Zelle um eine Stammzelle, eine Vorläuferzelle und/oder eine immortalisierte Zelle. Vorzugsweise handelt es sich um eine pluripotente oder multipotente embryonale, fötale, neonatale oder adulte Stammzelle. Besonders bevorzugte Stammzellen, die aus adultem Gewebe stammen, aber nicht auf diese beschränkt sind, umfassen
15 neuronale Stammzellen, Stammzellen aus dem Knochenmark, mesenchymale Stammzellen, hämatopoetische Stammzellen, epitheliale Stammzellen, sowie Stammzellen aus dem Verdauungstrakt, der Haut, dem Fettgewebe, dem Darm, der Plazenta und dem Duktus des Pankreas.

20 Eine Zelle der vorliegenden Erfindung umfasst auch eine Zelle, welche die oben beschriebene erfindungsgemäße enthält, und die in ein Gewebe oder ein Organ eines humanen oder tierischen Organismus eingebracht wird, bevor und/oder nachdem dieses Gewebe oder Organ in denselben oder einen anderen humanen oder tierischen Organismus transplantiert wird.

25

Eine bevorzugte Ausführungsform betrifft eine erfindungsgemäße Zelle in Form einer Zelllinie.

Eine erfindungsgemäße Zelllinie kann beispielsweise hergestellt werden durch
30 Transformation oder Infektion einer Zelllinie mit der oben beschriebenen

erfindungsgemäßen Nukleinsäure mit Hilfe von Methoden, die dem Fachmann geläufig sind, beispielsweise Transfektion, Transformation oder Infektion.

5 In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kodiert die Nukleinsäure zusätzlich eine Selektionskassette, insbesondere ein geeignetes Transfektions-Markergen und/oder Differenzierungs-Markergen.

10 Eine Selektionskassette im Sinne der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäuresequenz, die für mindestens ein Gen kodiert, das eine gezielte Selektion von bestimmten Zellen, beispielsweise transfizierter oder differenzierter Zellen, bewirkt.

Für eine solche Selektion können beispielsweise Differenzierungs-Markergene, Transfektions-Markergene und Reportergene verwendet werden. Als solche
15 werden überwiegend Gene verwendet, die eine Resistenz gegen bestimmte toxische Substanzen, beispielsweise Antibiotika, vermitteln. Die häufigsten in diesem Zusammenhang verwendeten Antibiotika sind Neomycin, Hygromycin (hph), Zeocin (Sh ble) und Puromycin (pacA). Weitere Beispiele für derartige Gene, insbesondere zur Selektion von Stammzellen, sind beispielsweise Gene, die
20 die Expression von Fluoreszenzmarkern, z.B. GFP, regulieren, mit deren Hilfe die zu selektierenden Zellen über fluoreszenzvermittelte Zell-Sortierung (FACS) aufgereinigt werden können. Weitere Beispiele von Selektionsmarkern sind Oberflächenmoleküle, z.B. Wachstumsfaktor-Rezeptoren, mit deren Hilfe Zellen über magnetische Immunobeads angereichert werden können (Bonini C., Science
25 Vol 276, 1719-1724, 1997). Weitere Beispiele sind Gene, die für eine Enzymaktivität (z.B. Thymidinkinase) kodieren, die einen Vorläufer einer toxischen Substanz, sog. "Prodrug" (z.B. Ganciclovir) in eine toxische Substanz umwandeln. In diesem Fall kann eine Negativ-Selektion erfolgen, d.h., es überleben nur die Zellen, die den dem Gen vorgeschalteten Promotor nicht
30 exprimieren.

Weitere Gene der erfindungsgemäßen Selektionskassette können lacZ (kodierend für β -Lactamase), β -Lactamase, Chloramphenicolacetyltransferase (CAT), Adenosin Deaminase (ADA), Dihydrofolatreduktase (DHFR), und Xanthinguaninphosphoribosyltransferase (XGPRT) sein. Dem Fachmann sind
5 Reagenzien bekannt, die gegebenenfalls hinzugezogen werden können, um die Funktion dieser Gene zu sichern oder zu steigern, beispielsweise zusätzliche Nukleinsäuresequenzen.

In einer bevorzugten Ausführungsform kodiert die Nukleinsäure zusätzlich ein
10 NK-Zellen-inhibierendes und/oder ein Killerzellen-inhibierendes Molekül, vorzugsweise ein humanes MHC-Klasse-I-Molekül, ein chimeres MHC-Klasse-I-Molekül oder ein virales MHC-Klasse-I-Homolog.

Unter Killerzellen ("killer cells") versteht der Fachmann eine heterogene
15 Population mononukleärer Zellen mit spontanem oder erworbenem zytotoxischen Potential. Unter NK-Zellen (natürliche Killerzellen) sind Killerzellen zu verstehen, die natürlich vorhanden sind, d.h., nicht das Resultat einer Immunantwort sind und somit nicht Antigen-spezifisch induziert sind.

20 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft eine Nukleinsäure, welche für mindestens einen Immunmodulator und mindestens ein durch Zugabe einer Wirksubstanz regulierbares Genexpressionssystem kodiert, wie oben bereits näher beschrieben wurde.

25 Bevorzugt kodiert die Nukleinsäure ebenfalls für mindestens ein die Genexpression kontrollierendes Element. Unter diesen Elementen sind beispielsweise Promotoren oder regulative Nukleinsäuresequenzen zu verstehen. Durch diese sowie durch (nachfolgend näher erläuterte) Expressionsvektoren können geeignete Bedingungen für die Expression einer Nukleinsäure geschaffen
30 werden. Im allgemeinen enthalten Expressionsvektoren die für die jeweilige Zelle bzw. das jeweils zu transkribierende Gen geeignete Promotoren.

- Beispiele für regulierbare Elemente, die konstitutive Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind Promotoren, die von der RNA-Polymerase III erkannt werden. Solche Promotoren für die konstitutive Expression in allen Zell- und Gewebetypen sind z.B. der pGK (Phosphoglyceratkinase)-Promotor, der CMV (Cytomegalievirus)-Promotor, der TK (Thymidinkinase)-Promotor, der EF1 α (Elongationsfaktor-1-alpha)-Promotor, der SV40 (Simian Virus)-Promotor, der RSV (Rous Sarcoma Virus)-Promotor und der pUB (Ubiquitin)-Promotor.
- 10 Beispiele für regulierbare Elemente, die zell- bzw. gewebespezifische Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind Promotoren oder Aktivatorsequenzen aus Promotoren oder Enhancern von solchen Genen, die für Proteine kodieren, die nur in bestimmten Zelltypen exprimiert werden. Derartige Promotoren sind beispielsweise der Insulin-Promotor für Beta-Zellen des Pankreas, der Sox-2-
- 15 Promotor für Nervenzellen, der Myosin-Schwere-Kette-Promotor für Muskelzellen, der VE-Cadherin-Promotor für Endothelzellen und der Keratinpromotor für Epithelzellen.

- Weitere Beispiele für regulierbare Elemente, die eine regulierbare Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind der Tetracyclinoperator in Kombination mit einem entsprechenden Repressor (Gossen M. et al., (1994) Curr. Opin. Biotechnol. 5, 516-20).
- 20

- Ebenfalls kann die Expression über regulative Nukleotidsequenzen, welche die Expression mengenmäßig und/oder zeitabhängig beeinflussen, gesteuert werden. Hierzu zählen beispielsweise Enhancersequenzen, Leadersequenzen, Polyadenylierungssequenzen, IRES-Sequenzen, Introns, Insulatorsequenzen und Repressorsequenzen.
- 25

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure kann auf einem oder mehreren Nukleinsäure-Molekülen lokalisiert sein. Erfindungsgemäß müssen im Falle mehrerer Nukleinsäure-Moleküle diese jedoch funktionell zusammenwirken. Im Sinne der vorliegenden Erfindung können z.B. (i) die Sequenz für das Genschaltermolekül, 5 (ii) die Sequenz für den Immunmodulator unter Regulation der Genschalterbindestelle und (iii) die Sequenzen für die Selektionsmarker auf drei verschiedenen Nukleinsäuremolekülen liegen. Durch Transkription des Genschaltermoleküls im Zellkern kann das nach erfolgter Translation im Cytoplasma gebildete Genschalterprotein wiederum im Zellkern an die 10 Genschalterbindestelle der Immunmodulatorsequenz binden und dessen Expression regulieren.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher auch ein Vektor, der mindestens eine erfindungsgemäße Nukleinsäure enthält.

15

Vektoren im Sinne der vorliegenden Erfindung können Plasmide, Shuttle-Vektoren, Phagemide, Cosmide, adenovirale Vektoren, retrovirale Vektoren, Expressionsvektoren und gentherapeutisch wirksame Vektoren sein.

20 Expressionsvektoren im Sinne der vorliegenden Erfindung umfassen mindestens eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, mindestens ein Translations-Initiations-Signal, ein Translations-Terminations-Signal und/oder ein Polyadenylierungs-Signal zur Expression in Eukaryoten.

25 Derartige Expressionsvektoren, insbesondere zur Expression in Säugetierzellen, sind u.a. kommerziell erhältlich, beispielsweise pIRES (Fa. Clontech, Heidelberg, DE), pCI-neo Vektor (Fa. Promega, Mannheim, DE), pCMV-Script (Fa. Stratagene, La Jolla, USA) und pcDNA3 Vektor (Fa. Invitrogen, Karlsruhe, DE) oder können aus einzelnen Elementen individuell zusammengestellt werden.

30

Erfindungsgemäße gentherapeutisch wirksame Vektoren sind zum Beispiel Plasmidvektoren, Virusvektoren, beispielsweise Adenovirus-Vektoren, retrovirale Vektoren oder Vektoren, die auf Replikons von RNA Viren beruhen (siehe z.B. Lindemann et al., 1997, Mol. Med. 3: 466-76; Springer et al., 1998, Mol. Cell. 2: 549-58; Khromykh, 2000, Curr. Opin. Mol. Ther.; 2: 555-69).

Gentherapeutisch wirksame Vektoren lassen sich auch dadurch erhalten, dass man die erfindungsgemäßen Nukleinsäure-Fragmente mit Liposomen komplexiert. Bei der Lipofektion werden kleine unilamellare Vesikel aus kationischen Lipiden durch Ultraschallbehandlung der Liposomensuspension hergestellt. Die DNA wird ionisch auf der Oberfläche der Liposomen gebunden, und zwar in einem solchen Verhältnis, dass eine positive Nettoladung verbleibt und die Plasmid-DNA zu 100% von den Liposomen komplexiert wird. Neben den Lipidmischungen DOTMA (1,2-dioleoyloxypropyl-3-trimethylammoniumbromid) und DPOE (dioleoylphosphatidylethanolamin) wurden inzwischen zahlreiche neue Lipidformulierungen synthetisiert und auf ihre Transfektionseffizienz bei verschiedenen Zelllinien getestet. (Behr et al. 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6982-6986; Gao und Huang, 1991, Biochem. Biophys. Acta 1189, 195-203; Felgner et al. 1994, J. Biol. Chem. 269, 2550-2561). Beispiele der neuen Lipidformulierungen sind DOTAP N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethyl-ammoniummethyl-sulfat oder DOGS (TRANSFECTAM; dioctadecylamidoglycylspermin). Hilfsstoffe, die den Transport von Nukleinsäuren in die Zellen erhöhen, können beispielsweise Proteine oder Peptide, die an DNA gebunden sind oder synthetische Peptid-DNA-Moleküle, die den Transport der Nukleinsäure in den Kern der Zell ermöglichen, sein (Schwartz et al., 1999, Gene Therapy 6: 282; Branden et al. 1999, Nature Biotechnol. 17: 784). Hilfsstoffe umfassen auch Moleküle, die die Freisetzung von Nukleinsäuren in das Zytoplasma der Zelle ermöglichen (Planck et al., 1994, J. Biol. Chem. 269, 12918; Kichler et al., 1997, Bioconj. Chem. 8, 213) oder beispielsweise Liposomen (Uhlmann und Peimann, 1990, Chem. Rev. 90, 544). Die

erfindungsgemäßen Zellen können auch zur Expression eines heterologen Gens verwendet werden.

5 Genterapeutische Vektoren können durch Transfektion (z.B. Elektroporation, Lipofektion, Calciumphosphatpräzipitation) oder Infektion in Zellen eingebracht werden.

10 Ferner ist ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein Arzneimittel, welches mindestens eine erfindungsgemäße Zelle und geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe enthält.

Das erfindungsgemäße Arzneimittel kann zur Prophylaxe und/oder Therapie von Erkrankungen dienen, beispielsweise von

- 15 (a) rheumatischen Erkrankungen, beispielsweise rheumatische Arthritis, Sjögren's Syndrom, Skleroderma, Dermatomyositis, Polymyositis, Reiter's Syndrom oder Behcet's Krankheit,
- (b) Diabetes Typ I oder LADA
- (c) Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse, beispielsweise Graves' Krankheit,
- (d) Autoimmunerkrankungen des zentralen Nervensystems, beispielsweise
- 20 Multiple Sklerose,
- (f) Hauterkrankungen, beispielsweise Psoriasis oder Neurodermitis,
- (g) entzündliche Darmerkrankungen, beispielsweise Ulcerative Colitis oder Morbus Crohn
- (h) Immunstörungserkrankungen
- 25 (i) Gefäßerkrankungen und
- (j) Transplantationsfolgeerkrankungen, beispielsweise Transplantatabstoßungsreaktionen.

30 Geeignete Hilfs- und Zusatzstoffe, die z.B. der Stabilisierung und/oder Konservierung des Arzneimittels dienen, sind dem Fachmann allgemein geläufig.

Hierzu zählen beispielsweise physiologische Kochsalzlösungen, Ringer-Dextrose, Ringer-Laktat, University of Wisconsin-Lösung/ViaSpan® (Belzer UW), EuroCollins Lösung, DMSO, Ethylenglykol, Sukrose, Trehalose, Ficoll, Perfluorokarbonate, entmineralisiertes Wasser, Stabilisatoren, Antioxidantien, 5 Komplexbildner, antimikrobielle Verbindungen, Proteinaseinhibitoren und/oder inerte Gase.

Die Verabreichung des erfindungsgemäßen Arzneimittels erfolgt nach Methoden, die für den jeweiligen Zell-, Gewebs- bzw. Organtyp, dem sie verabreicht werden 10 sollen, geeignet sind. Derartige Methoden sind dem Fachmann geläufig. Die Verabreichung des Arzneimittels kann danach beispielsweise

- für Leberzellen intravenös,
- für Herzmuskelzellen intramuskulär oder auch durch eine Katheter-basierte Verabreichung und
- 15 • für β -Zellen subkutan, intravenös, intraperitoneal, enkapsuliert oder intramuskulär

erfolgen.

Das Arzneimittel kann in den Organismus eingebracht werden entweder mit Hilfe 20 eines *ex vivo* Ansatzes, bei dem die Zellen aus dem Patienten entfernt, genetisch modifiziert, beispielsweise durch DNA-Transfektion, und danach erneut in den Patienten eingeführt werden oder mit Hilfe eines *in vivo* Ansatzes, bei welchem erfindungsgemäße gentherapeutisch wirksame Vektoren in den Körper des Patienten als nackte DNA oder unter Verwendung von viralen oder nicht-viralen 25 erfindungsgemäßen Vektoren oder erfindungsgemäßen Zellen eingebracht werden.

Es ist bekannt, dass die Dosierung von Arzneimitteln von mehreren Faktoren abhängt, beispielsweise von dem Körpergewicht, dem generellen 30 Gesundheitszustand, dem Ausmaß der Körperoberfläche, dem Alter des Patienten

sowie der Wechselwirkung mit anderen Medikamenten. Eine Dosierung hängt ebenfalls von der Art der Verabreichung ab. Die Dosierung ist daher im Einzelfall für jeden Patienten vom Fachmann zu bestimmen. Die Verabreichung des Arzneimittels kann einmal oder mehrmals am Tag und über mehrere Tage hinweg
5 erfolgen; auch dies ist vom Fachmann bestimmbar.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein humanes oder tierisches organspezifisches Gewebe und/oder ein humanes oder tierisches Säugetierorgan, das mindestens eine erfindungsgemäße Zelle enthält.

10

Die Begriffe organspezifisches Gewebe und Säugetierorgan im Sinne der vorliegenden Erfindung umfassen beispielsweise die Säugetierorgane Herz, Haut, Bauchspeicheldrüse, Nieren, Leber, Muskeln, Nerven, Auge, Lunge, Knochenmark, Knorpel, Knochen, Gefäße, Bindegewebe, bzw. Gewebe dieser
15 Organe.

Ferner ist ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein transgenes nicht-humanes Säugetier, das mindestens eine erfindungsgemäße Zelle enthält.

20 Transgene Tiere zeigen im Allgemeinen eine gewebespezifisch erhöhte Expression von Nukleinsäuren und sind daher für die Analyse beispielsweise von Immunreaktionen sehr geeignet. Bevorzugt werden transgene Mäuse verwendet.

Ein erfindungsgemäßes nicht-humanes Säugetier ist beispielsweise eine Maus,
25 eine Ratte, ein Meerschweinchen, ein Kaninchen, eine Kuh, ein Schaf, eine Ziege, ein Pferd, ein Schwein, ein Hund, eine Katze oder ein Affe.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung einer erfindungsgemäßen Zelle, eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines erfindungsgemäßen humanen oder
30 tierischen Säugetierorgans zur Transplantation in ein humanes oder tierisches

Säugetier. Vorzugsweise handelt es sich bei der erfindungsgemäßen Transplantation um eine Auto-, Allo- oder Xenotransplantation.

Unter Transplantation versteht der Fachmann die Übertragung oder auch
5 Verpflanzung von lebendem Material, beispielsweise Zellen, Gewebe und Organe, an eine andere Stelle desselben Organismus (Autotransplantation) oder von einem Organismus (Spender) in einen anderen Organismus (Empfänger). Bei der Transplantation in einen anderen Organismus wird unterschieden zwischen

- Synotransplantation, bei der Spender und Empfänger derselben Spezies
10 angehören und genetisch völlig oder weitgehend identisch sind,
- Allotransplantation, bei der Spender und Empfänger derselben Spezies angehören, aber immungenetisch different sind und
- Xenotransplantation, bei der Spender und Empfänger nicht derselben Spezies angehören und demzufolge immungenetisch völlig different sind.

15

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung einer erfindungsgemäßen Zelle, eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen Säugetierorgans zur Inhibierung einer Transplantatabstoßungsreaktion
20 in einem tierischen Säugetier oder im Menschen.

Unter einem tierischen Säugetier im Sinne der vorliegenden Erfindung ist beispielsweise eine Maus, eine Ratte, ein Meerschweinchen, ein Kaninchen, eine Kuh, ein Schaf, eine Ziege, ein Pferd, ein Schwein, ein Hund, eine Katze oder ein
25 Affe zu verstehen.

Unter einer Transplantatabstoßungsreaktion versteht der Fachmann einen Vorgang, durch den transplantiertes Material, beispielsweise Zellen, Gewebe oder ein Organ, vom Empfängerorganismus abgestoßen werden. Diese
30 Abstoßungsreaktion wird durch eine zelluläre und eine humorale Immunität hervorgerufen. Ursache dieser Abstoßungsreaktion ist eine Differenz der

Eiweißstruktur zwischen transplantiertem Material und Empfänger. Die Eiweißstruktur des übertragenen Gewebes wird vom Immunsystem des Empfängers als immunogen erkannt, wodurch eine Immunantwort ausgelöst wird.

- 5 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung einer erfindungsgemäßen Zelle, eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen Säugetierorgans zur Prophylaxe und/oder Therapie von Transplantationsfolgeerkrankungen und/oder Autoimmunerkrankungen. Beispiele
10 für derartige Erkrankungen wurden bereits vorangehend im Rahmen der Anwendungsgebiete des erfindungsgemäßen Arzneimittels beschrieben.

Die erfindungsgemäßen Verwendungen zur Inhibierung einer Transplantatabstoßungsreaktion sowie zur Prophylaxe und/oder Therapie von
15 Transplantationsfolgeerkrankungen und/oder Autoimmunerkrankungen können beispielsweise erfolgen, indem die erfindungsgemäßen Zellen, Gewebe und/oder Organe in ein humanes oder tierisches Säugetier eingebracht werden. Die Expression des erfindungsgemäßen Immunmodulators wird über das erfindungsgemäße regulierbare Genexpressionssystem gesteuert. Diese Steuerung
20 erfolgt durch die Verabreichung bzw. das Absetzen einer erfindungsgemäßen Wirksubstanz, wodurch das Genschaltermolekül aktiviert bzw. deaktiviert wird. Im Fall der Aktivierung aktiviert der Genschalter die Transkription des Zielgens, welches für den Immunmodulator kodiert. Der dadurch exprimierte Immunmodulator inhibiert im wesentlichen eine Abwehrreaktion des
25 Immunsystems auf die/das transplantierte Zelle, Gewebe bzw. Organ und zwar vor allem in der Transplantatregion des Organismus des humanen oder tierischen Säugetiers.

Eine Behandlung basierend auf der Verwendung von Zellen kann dadurch erreicht
30 werden, dass erfindungsgemäße Zellen aus Epithelzellen, Endothelzellen, Leberzellen, Derivaten von nicht-totipotenten embryonalen Stammzellen bzw.

nicht-totipotenten embryonalen Keimzellen, oder aus adultem Gewebe stammenden Stammzellen ausgewählt werden. Bevorzugte, aus adultem Gewebe stammende Stammzellen umfassen neuronale Stammzellen, Stammzellen aus dem Knochenmark, mesenchymale Stammzellen, hämatopoetische Stammzellen, 5 epitheliale Stammzellen, Stammzellen aus dem Verdauungstrakt, der Haut, dem Fettgewebe, dem Darm, der Plazenta und dem Duktus des Pankreas, die in ein humanes oder tierisches Säugetier eingebracht werden.

Ferner ist ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur 10 Herstellung einer erfindungsgemäßen Zelle, wobei das Verfahren die folgenden Schritte enthält:

- a. Einbringen mindestens einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure und/oder mindestens eines erfindungsgemäßen Vektors in eine transplantierbare humane oder tierische nicht-totipotente Zelle, und
- 15 b. Expression der Nukleinsäure unter Zugabe mindestens einer geeigneten Wirksubstanz zur Regulierung des Genschaltermoleküls.

Zum Einbringen einer Nukleinsäure, eines Vektors, eines Differenzierungs-Markergens oder eines Transfektions-Markergens oder einer Zelle gemäß 20 vorliegender Erfindung in eine Zelle werden die dem Fachmann geläufigen Standardmethoden der Transfektion, Transformation, Elektroporation oder Injektion verwendet.

Geeignete Bedingungen, die eine Expression der Nukleinsäure bewirken bzw. 25 verstärken, wurden bereits vorangehend beschrieben. Hierzu zählen beispielsweise Expressionsvektoren, Promotoren und regulierbare Nukleinsäuresequenzen, z.B. Enhancer, Polyadenylierungssequenzen.

Ferner ist ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein *in vitro*-Verfahren zur 30 Herstellung eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen organspezifischen

Gewebes und/oder eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen Säugetierorgans, wobei das Verfahren die folgenden Schritte enthält:

- a. Einbringen sowohl mindestens einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure und/oder mindestens eines erfindungsgemäßen Vektors als auch mindestens
5 eines Differenzierungs-Markergens in mindestens eine nicht-totipotente Stammzelle, eine nicht-totipotente Vorläuferzelle und/oder eine nicht-totipotente immortalisierte Zelle,
- b. Differenzierung der Zelle aus Schritt a.,
- c. Selektionieren der differenzierten Zelle aus Schritt b. und
- 10 d. Einbringen der selektierten Zelle aus Schritt c. in ein humanes oder tierisches organspezifisches Gewebes und/oder in ein humanes oder tierisches Säugetierorgan.

Bevorzugt wird in einer weiteren Ausführungsform in das genannte
15 erfindungsgemäße *in vitro*-Verfahren nach, vor oder gleichzeitig mit Schritt a. mindestens ein geeignetes Transfektions-Markergen in eine nicht-totipotente Stammzelle, eine nicht-totipotente Vorläuferzelle und/oder eine nicht-totipotente immortalisierte Zelle eingebracht und nach Schritt a. vorzugsweise die transfizierte Zelle aus Schritt a. selektioniert.

20 Die Differenzierung der Zellen, die die erfindungsgemäße Nukleinsäure enthalten, kann z.B. durch "Embroid Body Formation", vorzugsweise durch Kultivieren der Zellen in Lösungen, durch Kultivieren der Zellen in hoher Dichte, durch Zellaggregation, durch Entzug der Kultivierung auf Feederzellen, Entzug von
25 differenzierungshemmenden Substanzen (z.B. LIF oder von Feederzellen konditioniertes Medium), durch Hinzufügen von Cytokinen, Wachstumsfaktoren, Hormonen, Vitaminen (z.B. Nicotinamid), Retinsäure, Natriumbutyrat oder DMSO zu den kultivierten Zellen oder durch Hinzufügen anderer Substanzen von denen bekannt ist, dass sie die Differenzierung initiieren, eingeleitet werden. ,

30

Es sind zahlreiche Verfahren zur Selektionierung von Zellen bekannt.

Verfahren zur Selektionierung von Zellen aus differenzierten embryonalen Stammzellen sind beispielsweise beschrieben in Klug et al. (J. Clin. Invest. 1996 Jul 1; 98 (1):216-24) und Soria et al. (Diabetes. 2000 Feb.; 49 (2): 157-62).

5

Bei einer bevorzugten Methode der Selektion enthält die erfindungsgemäße Selektionskassette ein Markergen, und zwar ein Antibiotikum-Resistenzgen. Die Zellen werden selektiert bzw. isoliert, indem die differenzierten Zellen nach Hinzufügen eines geeigneten Antibiotikums während oder nach dem Differenzierungsschritt angereichert werden. Nur die differenzierten Zellen, welche das Markergen exprimieren, sind resistent gegen das Antibiotikum. Nicht differenzierte Zellen sterben ab. Nach der gleichen Methode kann auch die Selektion der transfizierten Zellen erfolgen.

15 Unter einem erfindungsgemäßen Antibiotikum wird ein Antibiotikum verstanden, gegen welches das bzw. die als erfindungsgemäße Selektionskassette verwendete(n) Antibiotikum-Resistenzgen(e) eine Resistenz erzeugt/en. Nach Hinzufügen des Antibiotikums zu den kultivierten Stammzellen überleben und differenzieren im wesentlichen nur solche Stammzellen, die den Reporter-Gen-
20 Expressionsvektor enthalten.

Ebenfalls kann ein Selektionsverfahren angewendet werden, wobei das bzw. die Gene der erfindungsgemäßen Selektionskassette kodieren für Luciferase, grünes fluoreszierendes Protein, rotes fluoreszierendes Protein und/oder gelbes
25 fluoreszierendes Protein. Die zu selektierenden Zellen werden mittels Fluoreszenz-aktivierter Zell-Sortierung (FACS) isoliert oder durch eine Affinitätsreinigung selektiert.

- 31 -

Weiterhin können Zellen mit Hilfe von Oberflächenmolekülen, z.B. Wachstumsfaktor-Rezeptoren, mittels magnetischen Immunobeads ankonzentriert werden (Bonini C., Science Vol 276, 1719-1724, 1997).

- 5 Vorzugsweise kann ein zweites Markergen in die Zellen eingebracht werden, wodurch eine Selektion der Zellen, in denen das Einbringen der Nukleinsäure und/oder des Vektors gemäß Schritt a. des erfindungsgemäßen *in vitro*-Verfahrens erfolgreich verlief, vorgenommen werden kann. Durch diese doppelte Selektion ist es möglich, eine ca. 90%ig, vorzugsweise ca. 95-100%ig reine Zellpopulation
10 der gewünschten Zellen zu erhalten.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Erzeugung eines erfindungsgemäßen transgenen nicht-humanen Säugetiers, wobei das Verfahren die folgenden Schritte enthält:

- 15 a. Einbringen sowohl mindestens einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure und/oder mindestens eines erfindungsgemäßen Vektors als auch mindestens eines geeigneten Transfektions-Markergens in mindestens eine Oocyte, Stammzelle, eine Vorläuferzelle und/oder eine immortalisierte Zelle eines nicht-humanen Säugetieres,
20 b. Selektionieren der transfizierten Zelle aus Schritt a.,
c. Einbringen der nach Schritt b. selektierten Zelle in mindestens eine nicht-humane Säugetier-Blastozyste,
d. Einbringen der Blastozyste aus Schritt c. oder des Embryos aus Schritt d. in eine nicht-humane Säugetier-Pflegemutter und
25 e. Identifizierung des sich aus genannter Blastozyste entwickelten transgenen nicht-humanen Säugetiers.

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich um eine pluripotente oder multipotente embryonale, fötale, neonatale oder adulte Stammzelle.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Erzeugung eines erfindungsgemäßen transgenen nicht-humanen Säugetiers, wobei das Verfahren die folgenden Schritte enthält:

- 5 a. Einbringen sowohl mindestens einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure und/oder mindestens eines erfindungsgemäßen Vektors als auch mindestens eines geeigneten Transfektions-Markergens in einen der beiden Vorkerne einer befruchteten nicht-humanen Säugetier-Oocyte,
- b. Einbringen der Säugetier-Oocyte aus Schritt a. in eine nicht-humane
10 Säugetier-Pflegemutter und
- c. Identifizierung des sich aus genannter Säugetier-Oocyte entwickelten transgenen nicht-humanen Säugetiers.

Es ist bevorzugt, dass die nicht-humane Säugetier-Pflegemutter durch Paarung mit
15 einem Männchen mit durchtrenntem Samenleiter scheinchwanger gemacht wurde.

Verfahren zum Einbringen von Blastozyten und/oder Oozyten in die Pflegemutter sind dem Fachmann bekannt. Es kann beispielsweise durch Injektion in den
20 Eileiter oder Uterus erfolgen (siehe z.B. Hogan, B., Beddington, R., Constantini, F. und Lacy, E., A laboratory Manual (1994), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Seite 173-181).

Die Identifizierung eines transgenen nicht-humanen Säugetiers kann
25 beispielsweise dadurch erfolgen, dass genomische DNA aus dem transgenen nicht-humanen Säugetier, z.B. aus dem Schwanz einer Maus extrahiert wird. In einer nachfolgenden PCR (Polymerase Ketten Reaktion) Analyse werden Primer verwendet, die spezifisch das Transgen für die erfindungsgemäße Nukleinsäure erkennen. Eine Integration des Transgens in das Genom kann auf diese Weise
30 nachgewiesen werden.

Eine weitere Möglichkeit der Identifizierung kann mittels Southern Blot erfolgen. Hierbei wird genomische DNA auf eine Membran übertragen und mittels DNA-Sonden, beispielsweise radioaktiv markierte DNA-Sonden, die spezifisch für das gesuchte Transgen sind, detektiert.

5

Verfahren zur Erzeugung eines erfindungsgemäßen transgenen nicht-humanen Säugetiers durch Regenerieren einer nicht-humanen Stammzelle, Oocyte, Vorläuferzelle oder immortalisierten Zelle zu einem transgenen nicht-humanen Tier, insbesondere von transgenen Mäusen sind dem Fachmann beispielsweise aus
10 DE 196 25 049 und US 4,736,866; US 5,625,122; US 5,698,765; US 5,583,278 und US 5,750,825 bekannt und umfassen transgene Tiere, die beispielsweise durch direkte Injektion von erfindungsgemäßen Expressionsvektoren in Embryonen oder Spermatozyten oder über die Transfektion von Expressionsvektoren in embryonale Stammzellen erzeugt werden können (siehe
15 z.B. Polites und Pinkert: DNA Mikroinjection and Transgenic Animal Production, Seite 15-68 in Pinkert, 1994: Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook, Academic Press, London, UK; Houdebine 1997, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands; Doetschman: Gene Transfer in Embryonic Stem Cells, Seite 115-146 in Pinkert, 1994, *supra*; Wood: Retrovirus-Mediated Gene Transfer, Seite 147-176 in Pinkert, 1994, *supra*; Monastersky: Gene Transfer Technology: Alternative Techniques and Applications, Seite 177-
20 220 in Pinkert, 1994, *supra*).

25 Zahlreiche Verfahren zur Herstellung von transgenen Tieren, insbesondere von transgenen Mäusen, sind dem Fachmann ebenfalls u.a. aus der WO 98/36052, WO 01/32855, DE 196 25 049, US 4,736,866, US 5,625,122, US 5,698,765, US 5,583,278 und US 5,750,825 bekannt und umfassen transgene Tiere, die beispielsweise über direkte Injektion von erfindungsgemäßen Vektoren in
30 Embryonen oder Spermatozyten oder über die Transfektion von Vektoren oder Nukleinsäuren in embryonale Stammzellen erzeugt werden können (siehe auch

Polites und Pinkert, in Pinkert, (1994) Transgenic animal technology, A Laboratory Handbook, Academic Press, London, UK, Seite 15 bis 68; Doetschman, in Pinkert, 1994, supra, Seite 115 bis 146).

- 5 In weiteren Ausführungsformen handelt es sich bei der Stammzelle, welche in den genannten erfindungsgemäßen *in vitro*-Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen Säugetierorgans und in den Verfahren zur Erzeugung eines erfindungsgemäßen transgenen nicht-
10 humanen Säugetiers verwendet wird, um eine pluripotente oder multipotente embryonale, fötale, neonatale oder adulte Stammzelle.

- Ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein transgenes nicht-humanes Säugetier, welches durch das oben beschriebene erfindungsgemäße
15 Verfahren erzeugt wurde, sowie der/die Nachkomme(n) dieses Säugetiers.

- Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines erfindungsgemäßen transgenen nicht-humanen Säugetiers zur Gewinnung einer humanen oder tierischen Zelle, eines humanen oder tierischen organspezifischen
20 Gewebes und/oder eines humanen oder tierischen Säugetierorgans für die Allo- und/oder Xenotransplantation.

- Im Fall der Zelltransplantation kann diese beispielsweise mittels eines Implantations-Verfahrens oder mittels einer Katheter-Injektionsmethode durch die
25 Blutgefäßwand erfolgen.

- Unter Gewinnung im Sinne der vorliegenden Erfindung ist die Entnahme der/des genannten Zelle, Gewebes und/oder Organs aus dem Organismus eines erfindungsgemäßen transgenen nicht-humanen Säugetiers zu verstehen. Methoden
30 für eine solche Entnahme sind geläufig.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines erfindungsgemäßen transgenen nicht-humanen Säugetiers, einer erfindungsgemäßen Zelle, eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen Säugetierorgans zum Auffinden von pharmakologisch aktiven Wirkstoffen und/oder zur Identifizierung von toxischen Substanzen.

Eine solche Methode könnte zum Beispiel darin bestehen, Zellen der vorliegenden Erfindung auf z.B. eine 96-well Mikrotiter-Platte auszusäen, dann eine zu untersuchende pharmakologisch aktive oder toxische Substanz zuzugeben und anschließend mittels Zellzahlbestimmung zu analysieren, ob die Substanz den Tod einer vermehrten Anzahl von Zellen bewirkt hat.

Unter den Begriffen pharmakologisch aktiver Wirkstoff und toxische Substanz im Sinne der Erfindung sind all jene Moleküle, Verbindungen und/oder Zusammensetzungen und Substanzgemische zu verstehen, die unter geeigneten Bedingungen einen pharmakologischen bzw. toxischen Einfluss auf einzelne Zellen, einzelne Gewebe, einzelne Organe oder den gesamten Organismus eines tierischen oder humanen Säugetiers ausüben. Mögliche pharmakologisch aktive Wirkstoffe und toxische Substanzen können einfache chemische (organische oder anorganische) Moleküle oder Verbindungen, Nukleinsäuren oder Analoga von Nukleinsäuren, anti-sense Sequenzen von Nukleinsäuren, Peptide, Proteine oder Komplexe und Antikörper sein. Beispiele sind organische Moleküle, die aus Substanz-Bibliotheken stammen und die auf ihre pharmakologische bzw. toxische Aktivität hin untersucht werden.

Pharmakologisch aktive Wirkstoffe sind beispielsweise Wirkstoffe, die Einfluss ausüben auf:

- die Teilungs- und/oder Überlebensfähigkeit von Zellen,

- 36 -

- die Sekretion von Proteinen, z.B. Insulin von Beta-Zellen des Pankreas, Dopamin von Nervenzellen,
 - die Muskelzellen-Kontraktion und/oder
 - das Wanderungsverhalten von Zellen,
 - 5 • die Stoffwechselaktivität von Zellen
 - die elektrophysiologische Aktivität von Zellen
 - die enzymatische Aktivität von Zellprodukten
 - die Zelldifferenzierung
 - die Zellorganisation zu Geweben bzw Organen
- 10 In Anwendung auf den gesamten Organismus eines tierischen oder humanen Säugetiers ist hierunter ein Einfluss auf beispielsweise
- das Herz-Kreislaufsystem,
 - das endokrine System,
 - das Magen-Darm-System,
 - 15 • das Nervensystem sowie
 - die Stoffwechselaktivitäten
- zu verstehen.

Toxische Substanzen sind beispielsweise Wirkstoffe, die

- 20 • Zellen nach bestimmten Signalen, beispielsweise Stress, zur Apoptose anregen,
- das Herz-Kreislaufsystem beeinflussen,
 - das Nervensystem beeinflussen und/oder
 - die Stoffwechselaktivitäten beeinflussen.

25

Die identifizierten pharmakologisch aktiven Wirkstoffe und toxischen Substanzen können gegebenenfalls kombiniert oder zusammen mit geeigneten Zusatz- und/oder Hilfsstoffen zur Herstellung eines Diagnostikums oder eines Arzneimittels zur Prophylaxe und/oder Therapie von

Transplantationsfolgeerkrankungen und/oder Autoimmunerkrankungen, wie vorangehend beispielhaft aufgeführt, verwendet werden.

5

Gegenstand der vorliegenden Erfindungen sind auch:

- 10 (i) Humane oder tierische nicht-totipotente Zelle enthaltend mindestens eine Nukleinsäure kodierend für mindestens einen Immunmodulator unter der Kontrolle eines durch Zugabe einer Wirksubstanz regulierbaren Genexpressionssystems.
- 15 (ii) Zelle nach (i), dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Zelle um eine Stammzelle, eine Vorläuferzelle und/oder eine immortalisierte Zelle handelt.
- (iii) Zelle nach (i) oder (ii), dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine pluripotente oder multipotente embryonale, fötale, neonatale oder adulte Stammzelle handelt.
- 20 (iv) Zelle nach mindestens einem der (i) bis (iii) in Form einer Zelllinie.
- (v) Zelle nach mindestens einem der (i)-(iv), dadurch gekennzeichnet, dass das regulierbare Genexpressionssystem ein Progesteron-Genexpressionssystem, ein Tetracyclin-Expressionssystem und/oder 25 ein Rapamycin-Genexpressionssystem ist.
- (vi) Zelle nach mindestens einem der (i)-(v), dadurch gekennzeichnet, dass der Immunmodulator mindestens eine der folgenden funktionellen 30 Eigenschaften aufweist:

- a. die Inhibierung einer Antigenerkennung, die durch T-Zellen vermittelt wird
- b. die Inhibierung eines über einen Rezeptor auf einer T-Zelle vermittelten Signals,
5
- c. die Aktivierung eines über einen Rezeptor auf einer T-Zelle vermittelten Signals,
- d. die Inhibierung des Wachstums von T-Zellen,
- e. die Inhibierung von Molekülen die das Überleben von T-Zellen unterstützen
10
- f. die Inhibierung von Effektormolekülen von T-Zellen(wie TNF-alpha, IFN-gamma),
- g. die Inhibierung der Adhäsion von T-Zellen,
- h. die Inhibierung einer T-Zell-kostimulatorischen Interaktion (die
15 Aktivierung eines Lymphozyten erfolgt über zwei Signale: zum einen erfolgt eine Stimulierung über den Antigenrezeptor, zum anderen erfolgt ein weiteres Signal zur klonalen Expansion und Differenzierung eines ungeprägten Lymphozyten; diese kostimulatorische Interaktion kann durch einen Immunmodulator inhibiert werden)
- i. die Inhibierung der Aktivierung, der Proliferation, des Überlebens, der
20 Antigenpräsentation, des Signalisierens, und/oder der Effektorfunktionen von weiteren Zellen, die an einer Immunantwort beteiligt sind, wie z.B. allgemeine und spezielle antigenpräsentierende Zellen, insbesondere z.B. dendritische Zellen und Monozyten/Makrophagen B-Zellen, neutrophile
25 Granulozyten und NK Zellen die Inhibierung der zellulären Interaktion von unterschiedlichen Zellen, entweder über Oberflächenrezeptoren oder über sekretierte Moleküle, wie z.B. Zytokine, Chemokine oder Wachstumsfaktoren, die an einer Immunantwort beteiligt sind, wie z.B.

allgemeine und spezielle antigenpräsentierende Zellen, insbesondere z.B. dendritische Zellen und Monozyten/Makrophagen, T-Zellen, B-Zellen, neutrophile Granulozyten und NK Zellen,

- 5 j. die Inhibierung der Migration von Zellen, die an einer Immunantwort beteiligt sind, wie z.B. spezielle antigenpräsentierende Zellen, insbesondere z.B. dendritische Zellen und Monozyten/Makrophagen, T-Zellen, B-Zellen, neutrophile Granulozyten und NK Zellen,
- k. die Inhibierung von Komponenten des Komplementsystems
- 10 l. die Inhibierung von phagozytotischen Aktivitäten im Zusammenhang mit der Präsentation von Fremd- oder Autoimmunantigenen, oder durch die Bindung von Antikörpern an Antigene, und/oder
- m. die Inhibierung von Entzündungsreaktionen.

- 15 (vii) Zelle nach mindestens einem der (i) bis (vi), dadurch gekennzeichnet, dass der Immunmodulator ein Antikörper ist.

(viii) Zelle nach mindestens einem der (i) bis (vi), dadurch gekennzeichnet, dass der Immunmodulator

- a. ein Rezeptor ist
- 20 b. ein löslicher sekretierter Rezeptor ist
- c. ein sekretiertes Protein oder Peptid ist

- (ix) Zelle nach (viii), wobei der Immunmodulator ein Fusionsprotein ist aus einem mutierten IL 15 und einem Fc-Fragment, wobei das Fc-Fragment an den C-Terminus des mutierten IL 15 Moleküls, bevorzugt über die Hinge-Region, fusioniert ist.
- 25

- (x) Zelle nach (ix), dadurch gekennzeichnet, dass das Fc-Fragment des Antikörpers ein solches von einem IgG, insbesondere ein humanes

IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 oder ein analoges Säugetier IgG oder ein IgM, insbesondere ein humanes IgM oder ein analoges Säugetier IgM ist.

- 5 (xi) Zelle nach mindestens einem der (i)1 bis (x), dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure zusätzlich eine Selektionskassette, insbesondere ein geeignetes Transfektions-Markergen und/oder Differenzierungs-Markergen, kodiert.
- 10 (xii) Zelle nach mindestens einem der (i) bis (xi), dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure zusätzlich ein Molekül kodiert, das NK-Zellen- und/oder Killerzellen inhibiert.
- 15 (xiii) Zelle nach mindestens einem der (i)-(xi), dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure zusätzlich ein Molekül kodiert, dass
- a. Dendritische Zellen inhibiert
- b. Monocyten und oder Makrophagen inhibiert
- c. B-Zellen inhibiert
- d. Polmorphnukleäre Zellen, z.B. Neutrophile Granulozyten inhibiert
- 20 (xiv) Zelle nach (xiii), dadurch gekennzeichnet, dass das genannte inhibierende Molekül ein humanes MHC-Klasse-I-Molekül, ein chimeres MHC-Klasse-I-Molekül oder ein virales MHC-Klasse-I-Homolog ist.
- 25 (xv) Nukleinsäure kodierend für mindestens einen Immunmodulator und mindestens ein durch Zugabe einer Wirksubstanz regulierbares Genexpressionssystem.
- 30 (xvi) Vektor enthaltender mindestens einen Nukleinsäure nach (xv).

- (xvii) Arzneimittel, enthaltend mindestens eine Zelle nach einem der (i) bis (xiv) und geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe.
- 5 (xviii) Humanes oder tierisches organspezifisches Gewebe und/oder humanes oder tierisches Säugetierorgan, enthaltend mindestens eine Zelle nach einem der (i) bis (xiv).
- (xix) Transgenes nicht-humanes Säugetier, enthaltend mindestens eine Zelle nach einem der (i) bis (xiv).
- 10 (xx) Verwendung einer Zelle nach einem der (i) bis (xiv) und/oder eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines humanen oder tierischen Säugetierorgans nach (xviii) zur Transplantation in ein humanes oder tierisches Säugetier.
- 15 (xxi) Verwendung nach (xx), dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine Allo-, Auto- oder Xenotransplantation handelt.
- 20 (xxii) Verwendung einer Zelle nach einem der (i) bis (xiv), einer Nukleinsäure nach (xv), eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines humanen oder tierischen Säugetierorgans nach (xviii) zur Herstellung eines Medikamentes zur Inhibierung einer Transplantatabstoßungsreaktion in einem humanen oder tierischen Säugetier, gegebenenfalls in Anwesenheit mindestens
- 25 eines Immunmodulators.
- 30 (xxiii) Verwendung einer Zelle nach einem der (i) bis (xiv), einer Nukleinsäure nach (xv), eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines humanen oder tierischen Säugetierorgans nach (xviii) zur Herstellung eines Medikamentes zur

Prophylaxe und/oder Therapie von Transplantationsfolgeerkrankungen
und/oder Autoimmunerkrankungen.

- 5 (xxiv) Verfahren zur Herstellung einer Zelle nach einem der (i) bis (xiv)
enthaltend folgende Schritte:
- c. Einbringen mindestens einer Nukleinsäure nach (xv) und/oder mindestens
eines Vektors nach (xvi) in eine transplantierbare humane oder tierische
nicht-totipotente Zelle, und
- 10 d. Expression der Nukleinsäure unter Zugabe mindestens einer geeigneten
Wirksubstanz zur Regulierung des Genschalters.
- (xxv) *In vitro*-Verfahren zur Herstellung eines humanen oder tierischen
organspezifischen Gewebes und/oder humanen oder tierischen
Säugetierorgans nach (xviii), enthaltend die folgenden Schritte:
- 15 e. Einbringen sowohl mindestens einer Nukleinsäure nach (xv) und/oder
mindestens eines Vektors nach (xvi) und als auch mindestens eines
Differenzierungs-Markergens in mindestens eine nicht-totipotente
Stammzelle, eine nicht-totipotente Vorläuferzelle und/oder eine nicht-
totipotente immortalisierte Zelle,
- 20 f. Differenzierung der Zelle aus Schritt a.,
g. Selektionieren der differenzierten Zelle aus Schritt b. und
h. Einbringen der selektierten Zelle aus Schritt c. in ein humanes oder
tierisches organspezifischen Gewebes und/oder in ein humanes oder
tierisches Säugetierorgan.
- 25 (xxvi) Verfahren nach (xxv), dadurch gekennzeichnet, dass nach, vor oder
gleichzeitig mit Schritt a. mindestens ein geeignetes Transfektions-
Markergen in mindestens eine nicht-totipotente Stammzelle, eine
nicht-totipotente Vorläuferzelle und/oder eine nicht-totipotente
30 immortalisierte Zelle eingebracht wird und nach Schritt a.
vorzugsweise die transfektierte Zelle aus Schritt a. selektioniert wird.

(xxvii) Verfahren nach einem der (xxv) oder (xxvi), dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine pluripotente oder multipotente embryonale, fötale, neonatale oder adulte Stammzelle handelt.

5

(xxviii) Verfahren zur Erzeugung eines transgenen nicht-humanen Säugetiers nach (xviii), enthaltend folgende Schritte:

- f. Einbringen sowohl mindestens einer Nukleinsäure nach (xv) und/oder mindestens eines Vektors nach (xvi) als auch mindestens eines geeigneten Transfektions-Markergens in mindestens eine Oocyte, Stammzelle, eine
10 Vorläuferzelle und/oder eine immortalisierte Zelle eines nicht-humanen Säugetieres,
- g. Selektionieren der transfizierten Zelle aus Schritt a.,
- h. Einbringen der nach Schritt b. selektierten Zelle in mindestens eine nicht-
15 humane Säugetier-Blastozyste,
- i. Einbringen der Blastozyste aus Schritt c. in eine nicht-humane Säugetier-Pflegemutter und
- j. Identifizierung des sich aus genannter Blastozyste entwickelten transgenen nicht-humanen Säugetiers.

20

(xxix) Verfahren nach (xxviii), dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine pluripotente oder multipotente embryonale, fötale, neonatale oder adulte Stammzelle handelt.

25 (xxx) Verfahren zur Erzeugung eines transgenen nicht-humanen Säugetiers nach (xix), enthaltend folgende Schritte:

- d. Einbringen sowohl mindestens einer Nukleinsäure nach (xv) und/oder mindestens eines Vektors nach (xvi) als auch mindestens eines geeigneten Transfektions-Markergens in einen der beiden Vorkerne
30 einer befruchteten nicht-humanen Säugetier-Oocyte,

- e. Einbringen der Säugetier-Oocyte aus Schritt a. in eine nicht-humane Säugetier-Pflegemutter und
- f. Identifizierung des sich aus genannter Säugetier-Oocyte entwickelten transgenen nicht-humanen Säugetiers.

5

(xxxi) Transgenes nicht-humanes Säugetier, dadurch gekennzeichnet, dass es nach dem Verfahren nach einem der (xxviii) oder (xxix) erzeugt wurde.

10

(xxxii) Transgenes nicht-humanes Säugetier, dadurch gekennzeichnet, dass es ein Nachkomme des Säugetieres nach (xxx) ist.

15

(xxxiii) Verwendung eines transgenen nicht-humanen Säugetiers nach einem der (xix), (xxx) oder (xxxi) zur Gewinnung einer nicht-humanen Zelle, eines nicht-humanen organspezifischen Gewebes und/oder eines nicht-humanen Säugetierorgans für die Allo- und/oder Xenotransplantation.

20

(xxxiv) Verwendung eines transgenen nicht-humanen Säugetiers nach einem der (xix), (xxx) oder (xxxi), eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines humanen oder tierischen Säugetierorgans nach (xviii) zum Auffinden von pharmakologisch aktiven Wirkstoffen und/oder zur Identifizierung von toxischen Substanzen.

25

30

Die folgenden Figuren und Beispiele sollen die vorliegende Erfindung verdeutlichen ohne sie jedoch zu beschränken:

- 5 Abb. 1 zeigt eine Immunoblotanalyse von Medienüberständen der Transfektion 17x4/IL15/Oligo + pcDNA3switch +/- Mifepriston (Beispiel 3);

Abb. 2 zeigt eine schematische Abbildung des Wirkmechanismus des erfindungsgemäßen durch Zugabe einer Wirksubstanz regulierbaren
10 Genexpressionssystems.

Der Genschalter der vorliegenden Erfindung ist ein chimäres Protein, das aus drei funktionellen Einheiten besteht:

- 15 i) eine Gal4-DNA-Bindungsdomäne (Gal-DBD), welche die Genschalterbindungsdomäne UAS erkennt. Die UAS-Sequenz der Erfindung enthält vier Kopien eines Sequenzmotivs aus 17 Nukleotiden, von denen jedes Motiv als Bindungsstelle für zwei Gal4-DBD Moleküle dienen kann.
- 20 ii) Eine verkürzte Ligandenbindungsdomäne des menschlichen Progesteron-Rezeptors (PR-LBD), welche die Bindung der Wirksubstanz Mifepriston an den Genschalter vermittelt und die Konversion des Genschalterproteins in eine aktive Konformation durch Dimerisierung bewirkt.
- iii) Eine p65 Aktivierungsdomäne (P65-AD), welche die Transkription des Zielgens durch den Genschalter aktiviert.

- 25 Bei Abwesenheit von Mifepriston wird der Genschalter durch den vorgeschalteten ubiquitären schwachen basalen minimalen Thymidinkinase Promoter (pTK) in geringem Mengen transkribiert. Diese Genschaltermoleküle liegen aber als Monomere vor und können damit noch keine DNA-Bereiche binden oder die Transkription initiieren. Nach Zugabe der Wirksubstanz Mifepriston erfolgt die

- Aktivierung des Genschaltersystems. Das Liganden-gebundene Genschalter-Homodimer bindet an alle Bereiche der DNA, die UAS-Sequenzen enthalten (wie z.B. die regulatorische Region vor dem durch den TATA-Promoter regulierten Gen für MutIL15-mFc) und aktiviert somit die Transkription des
- 5 immunomodulatorischen Proteins. Da dem TK-Promoter des Genschalterproteingens zusätzlich DNA-Bereiche mit UAS-Sequenzen vorgeschaltet sind, wird gleichzeitig in einem autoregulatorischen Rückkopplungsmechanismus die Transkription des Genschalterproteins selbst aktiviert und somit die Menge des aktiven Genschalters erhöht.
- 10 Weiterhin können die die aus Zelllinien hergestellten transplantierbaren Zellen der Erfindung Markergene wie z.B. für Resistenzen gegen die Antibiotika Neomycin (Neo-R) bzw. Hygromycin (Hygro-R) enthalten. Die Markergene, welche von einem ubiquitären Promoter wie z.B. dem Phosphoglyceratkinase-Promoter (pGK) reguliert werden, dienen der Selektion der Zelle auf Aufnahme des DNA-
- 15 Konstruktes. Die durch einen zelltypspezifischen Promoter, wie z.B. den Ratten-Insulinpromoter (RIP) kontrollierten Markergene dienen der Selektion von transgenen Zellen eines spezifischen Zelltyps.

- Zur Generierung der transgenen Tiere der Erfindung müssen die Zellen mindestens die Elemente 1 und 2 enthalten. Zur Herstellung der transgenen Zellen aus Zelllinien
- 20 können die Zellen noch zusätzlich Element 3 enthalten.

Beispiele

- 25 Zur Untersuchung und Demonstration der Wirkungsweise der regulierten Expression des immunmodulierenden Proteins MutIL-15/mFc wurden zwei experimentelle Modelle entwickelt:

a) Transgene Zelllinie zur Transplantation

Bei diesem Modell wurden Stammzellen mit Vektor-Konstrukten transfiziert, die zusätzlich zu den Elementen für die regulierbare Expression des Immunmodulators MutIL-15/mFc eine Selektionskassette enthielten, die die Herstellung eines spezifischen Zelltyps (z.B. Insulin-produzierende Zelle) ermöglichte (siehe US 5,733,727). Auf diese Weise können aus undifferenzierten transgenen Stammzellen differenzierte Zellen eines spezifischen Zelltyps hergestellt und isoliert werden. Diese transgenen differenzierten Zellen können in eine geeignete Empfängermaus (z.B. diabetische Maus) transplantiert werden. Werden die transplantierten Tiere mit Mifepriston behandelt, bilden die transplantierten Zellen selbst MutIL-15/mFc und verhindern damit ihre eigene Abstoßung.

b) Transgenes Mausmodell

Es wurden transgene Mäuse generiert, die im Genom ein Konstrukt enthalten, das die regulierte Expression von MutIL-15/mFc durch Zugabe von Mifepriston bewirkt. Da die Expression von MutIL-15/mFc durch einen ubiquitären Promoter reguliert wird, produzierten die Mäuse MutIL-15/mFc, wenn sie durch Zugabe von Mifepriston stimuliert werden. Aus den transgenen Tieren können Organe (z.B. Herz, Niere) oder Zellen (Inselzellen, neuronale Zellen) entnommen und in eine andere nicht-transgene Maus transplantiert werden. Werden die transplantierten Tiere mit Mifepriston behandelt, bildet das transplantierte Organ/Zellen selbst MutIL-15/mFc und verhindert damit seine eigene Abstoßung.

Beispiel 1: Vektorklonierung für ein transgenes Mausmodell

In dem Vektor 17x4/pGL3 Basic (modifizierter pGL3Basic Vektor von Promega mit TATA Box und 4 Kopien des 17-Oligomers als Genschalterbindungsstelle) wurde das Luciferase-Gen durch das Gen für ein Fusionsprotein aus mutiertem IL-15 Protein und Maus FcTeil (im weiteren bezeichnet als MutIL-15/mFc: Kim et al., The Journal of Immunology, 1998, 160: 5742-5748), das zusätzlich eine CD5

Leadersequenz enthält (Jones H., Nature 323 (6086), 346-349, 1986), ersetzt. Dadurch wird das CD5-MutIL-15/mFc Gen durch eine SV40polyA Sequenz abgeschlossen (Vektornamen 17x4/IL15). Anschliessend wurde vor den 17-Oligomeren ein Oligonukleotid mit den Schnittstellen SbfI und PmeI eingeführt
5 (Vektornamen 17x4/IL15/Oligo). Diese Schnittstellen dienen zum Einfügen des Gens für das Genschaltermolekül (GS = Gal4-DBD/hPR-LBD/p65-AD) inklusive vorgeschalteter regulatorischer Region (Gal4UAS-PTK-IVS8), welche aus dem Vektor pswitch (Invitrogen, Karlsruhe) isoliert wurden (Vektornamen 17x4/IL15/Oligo/GS). Zusätzlich wurde alternativ ein Vektor hergestellt, in den
10 zwischen TATA Box und Startcodon des CD5- MutIL-15/mFc Gens das Intron IVS8 (ebenfalls aus pswitch) eingesetzt wurde (Vektornamen 17x4/IL15/Oligo/IVS8/GS). Die Übergänge zwischen den Segmenten aller Klonierungsprodukte wurden durch Sequenzierungen überprüft.

15 Beispiel 2: Vektorklonierung für transgene in vitro Transplantate aus Insulin-produzierenden Zellen

Diese Vektoren wurden analog zu den Vektoren für das transgene Mausmodell hergestellt. Zusätzlich enthalten diese Plasmide jedoch noch ein Fragment, welches ein vom Ratten-Insulinpromoter (RIP) reguliertes Neomycin-
20 Resistenzgen (neo) sowie ein vom Maus-Phosphoglyceratkinase-Promoter (pGK) reguliertes Hygromycin-Resistenzgen (hygro) enthält. Diese Elemente wurden 5' unterhalb des CD5- MutIL-15/mFc Gens eingefügt und alternativ in zwei Transkriptionsrichtungen kloniert. (Vektornamen 17x4/IL15/Oligo/RIPhn/GS und 17x4/IL15/Oligo/RIPnh/GS). Zusätzlich wurden alternativ Vektoren hergestellt,
25 in denen zwischen TATA Box und Startcodon des CD5-mutIL15-mFc Gens das Intron IVS8 (ebenfalls aus pswitch) eingesetzt wurde (Vektornamen 17x4/IL15/Oligo/RIPhn/IVS8/GS sowie 17x4/IL15/Oligo/RIPnh/IVS8/GS). Die Übergänge zwischen den Segmenten aller Klonierungsprodukte wurden durch Sequenzierungen überprüft.

Beispiel 3: Überprüfung der regulierten Expression und Sekretion von CD5-mutIL15-mFc in den in Beispiel 1 und 2 genannten Vektoren

Es wurden transiente Transfektionen von cos-7 Zellen (DSMZ, Braunschweig) und A293 Zellen (Quantum, Montreal, Canada) durchgeführt. Dazu wurden am Tag vor der Transfektion $5-7,5 \times 10^5$ Zellen/Loch auf 6-Loch Platten ausgesät. Für die Transfektion, die mit 1-2 μg DNA/Loch durchgeführt wurde, wurden je 10-20 μl DNA der Konzentration 10 ng/ml mit je 250 μl OptiMEM-I Medium (Life Technologies, Karlsruhe) gemischt. Parallel dazu wurden je 2 μl Lipofectamin 2000 (Life Technologies, Karlsruhe # 11668-019) / μg DNA mit 250 μl OptiMEM-I Medium (Life Technologies, Karlsruhe # 31985-062) gemischt. Gleiche Volumina beider Ansätze wurden gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. In der Zwischenzeit wurden die 6-Loch Platten mit den 50-70 % konfluenten Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend je 1,5 ml Wachstumsmedium/Loch (DMEM + 10 % FCS) zugegeben. Zu diesen Zellen wurden pro Loch je 500 μl des DNA/Lipofectamingemisches tropfenweise hinzugefügt. Zellen, die mit Mifepriston stimuliert wurden, erhielten zusätzlich je 2 μl einer 10^{-5} M Lösung von Mifepriston (Sigma, Deisenhofen; Endkonzentraion 10^{-8} M) in 80 % Ethanol (Invitrogen, Karlsruhe). Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und 2 ml frisches Medium (DMEM + 10 % FCS) zugegeben. Die mit Mifepriston stimulierten Zellen erhielten dabei erneut zusätzlich je 2 μl Mifepriston. 3 Tage nach der Transfektion wurde das Medium von den Zellen abgenommen, zur Entfernung von Zellresten zentrifugiert und anschließend bei -80°C weggefroren. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, in PBS abgeschabt, in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und für 30-60 min bei 4°C mit je 50 μl RIPA-Puffer (PBS mit 1 % IGEPAL/Sigma, Deisenhofen I-3021, 0.5% Natriumdesoxycholat, 0,1 % SDS, 4mM EDTA und Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail/ Roche, Mannheim #1873580) lysiert. Die zentrifugierten Lysate wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Sekretion von CD5-mutIL15-mFc wurde mit Hilfe eines ELISA, der den Maus-Fc Teil des Fusionsproteins erkennt, analysiert. Dafür wurden 96-Loch

- 50 -

Platten (Nunc, Wiesbaden# 439454) mit je 100 µl eines anti-Maus IgG2a Antikörpers (Klon R11-89, BD PharMingen, Heidelberg # 02251D-553446) für eine Stunde bei 37 °C beschichtet. Anschließend wurden die Platten dreimal mit PBS gewaschen und für eine Stunde bei 37 °C mit DMEM+10%FCS inkubiert, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Auf die beschichteten Platten wurden je 100 µl unverdünnte Mediumüberstände gegeben, diese für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und danach 5x mit je 200 µl PBS/0,1% Tween20 und 1x mit je 200 µl PBS gewaschen. Der enzymgekoppelte Antikörper HRP anti-Maus IgG 2a Klon R19-15 (BD PharMingen, Heidelberg # 02017E-553391) wurde zur Detektion des Maus-Fc Teils ebenfalls wieder für 1 h bei Raumtemperatur mit den Platten inkubiert und die Platten anschließend erneut wie oben beschrieben gewaschen. Die gebundene Menge des Fusionsproteines wurde durch eine Farbreaktion nach Zugabe einer OPD-haltigen Substratlösung (25 ml 0,1 M Zitronensäure, 25 ml 0,1 M Dikaliumhydrogenphosphat, ad 100 ml mit H₂O+ 1 Tablette OPD (Sigma Deisenhofen #P8412) + 40 µl H₂O₂ 30%) sichtbar gemacht, durch Zugabe von 3 M HCl abgestoppt und anschließend in einem ELISA-Reader (µQuant, BIO-TEK Instruments Inc.) bei 490 nm gemessen.

Des weiteren wurden unverdünnte Medienüberstände im Immunoblot analysiert. Dazu wurden Medienüberstände mit Lämmli-Probenpuffer gemischt, für 5 Minuten bei 92 °C erhitzt, anschließend auf ein 12,5 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen und bei 150 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher u. Schuell, Dassel CD0564-1) übertragen. Die Membran wurde zur Absättigung unspezifischer Bindungen mit 5 % Milchpulver/PBS/0,1% Tween20 behandelt. Danach wurde sie für 16 Stunden bei 4°C mit einer 1:500 Verdünnung von Maus-anti-humanem IL15 Antikörper (Becton-Dickinson, Heidelberg #554712) inkubiert, ausgiebig mit PBS/0,1% Tween20 gewaschen und danach für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einer 1:3000 Verdünnung eines Peroxidase-gekoppelten Schaf-anti-Maus Antikörpers (Amersham, Freiburg #NA9310) behandelt. Die Membran wurde nach ausgiebigem Waschen für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit Detektionsreagenz (NEN; Bad

Homburg #NE103E) behandelt und die Farbreaktion durch Auflegen eines Röntgenfilmes detektiert.

Die Analysen von Medienüberständen von transfizierten Zellen mit bzw. ohne Mifepriston-Zugabe zeigten folgendes Ergebnis:

- 5 Folgende Transfektionen wurden durchgeführt :
1. mCD5.6 (Positivkontrolle für MutIL-15/mFcsekretion, Vektor mit CD5-MutIL-15/mFc unter der Kontrolle eines CMV-Promoters)
 2. 17x4/IL15/Oligo +/- Mifepriston (Negativkontrolle ohne Genschalter)
 3. 17x4/IL15/Oligo + pcDNA3switch +/- Mifepriston
 - 10 4. 17x4/IL15/Oligo/GS +/- Mifepriston
 5. 17x4/IL15/Oligo/GS + pcDNA3switch +/- Mifepriston
 6. 17x4/IL15/Oligo/IVS8/GS +/- Mifepriston
 7. 17x4/IL15/Oligo/IVS8/GS + pcDNA3switch +/- Mifepriston
- 15 Keine signifikante Expression von MutIL-15/mFc wurde in Zellen beobachtet, die mit dem Kontrollvektor ohne Genschaltermolekül (2.) transfiziert worden waren sowie in Zellen, die nicht mit Mifepriston stimuliert worden waren. Nach Transfektion mit Konstrukten, die lediglich das autoregulierten Genschaltermolekül enthielten (4.+6.), konnte mit Hilfe des ELISA nur eine
- 20 geringe Erhöhung der Sekretion von MutIL-15/mFc nach Mifepriston-Stimulation nachgewiesen werden. Dies beruhte vermutlich auf einer unzureichenden Bildung von aktiven Genschaltermolekülen durch autoregulatorische Genaktivierung im Verlauf der transienten Transfektion. Daher wurde die Genschaltermenge extern durch Kotransfektion mit dem Vektor pcDNA3switch (Genschalter unter
- 25 Kontrolle des CMV-Promoters) erhöht, der eine konstant hohe Produktion an Genschalter bewirkt. In diesen Kotransfektionen enthielt der Medienüberstand von Zellen, die sowohl mit Genschalter-freien (3.) als auch enthaltenden

Konstrukten (5.+7.) transfiziert worden waren, nach Mifepriston-Behandlung eine erhöhte Menge an MutIL-15/mFc, die durch ELISA nachgewiesen wurde.

Tabelle 1: Messung von MutIL-15/mFc in Medienüberständen von transient
5 transfizierten A293 Zellen (Mittel von Doppelwerten)

| | Konstrukt | pcDNA3switch | Mifepriston | M 490 Corr. |
|---|-------------------------|--------------|-------------|----------------|
| 1 | mCD5.6 | - | - | 1.750 |
| 2 | 17x4/II15/Oligo | - | + | 0.006 |
| 3 | 17x4/II15/Oligo | + | - | < 0.000 |
| | 17x4/II15/Oligo | + | + | 0.067 |
| 4 | 17x4/II15/Oligo/GS | - | - | < 0.000 |
| | 17x4/II15/Oligo/GS | - | + | 0.006 |
| 5 | 17x4/II15/Oligo/GS | + | - | 0.004 |
| | 17x4/II15/Oligo/GS | + | + | 0.019 |
| 6 | 17x4/II15/Oligo/IVS8/GS | - | - | 0.006 |
| | 17x4/II15/Oligo/IVS8/GS | - | + | 0.009 |
| 7 | 17x4/II15/Oligo/IVS8/GS | + | - | 0.010 |
| | 17x4/II15/Oligo/IVS8/GS | + | + | 0.022 |

Immunoblotanalysen von Medienüberständen der Transfektion 3. (Abb. 1)
bestätigen ebenfalls, dass eine erhöhte Menge an MutIL-15/mFc (50 kDa Bande)
10 nach Mifepriston-Stimulierung (Spur 1) im Vergleich zu unstimulierten Zellen (Spur
2) produziert wird.

Diese Ergebnisse beweisen, dass die Transkription und Sekretion von MutIL-15/mFc
Fusionsprotein durch Mifepriston-Zugabe in Zellen induziert werden kann, die mit
den oben vorgestellten Vektoren (z.B. 17x4/IL15/Oligo/IVS8/GS) transfiziert
15 worden waren. Damit wurde die Funktionalität der regulierten Expression von
MutIL-15/mFc bewiesen.

Beispiel 4: Überprüfung der regulierten Expression und Funktionalität des Genschalterproteins (Gal4UAS-PTK-IVS8-Gal4-DBD/hPR-LBD/p65-AD) in den in Beispiel 1 und 2 genannten Vektoren

- 5 Wie zuvor erwähnt war die Anzahl an aktiven Genschaltermolekülen, die in transient transfizierten Zellen, die nur autoregulierten Genschalter produzierten (Transfektion mit 17x4/IL15/Oligo/GS und 17x4/IL15/Oligo/IVS8/GS), gering.

Da der ELISA nicht sensitiv genug ist, um eine Expression von MutIL-15/mFc auf Einzelzellebene zu detektieren, wurden Kotransfektionen mit dem Plasmid
10 pGene/V5-His/lacZ (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Dieser Vektor enthält ein lacZ Gen, dessen Transkription ebenfalls durch Genschalterbindungsstellen reguliert wird. Dies bedeutet, dass nur in solchen Zellen β -Galaktosidase produziert wird, in denen gleichzeitig durch Mifepriston-Stimulierung aktiver Genschalter enthalten ist. Der Genschalter wurde durch einen zweiten Vektor (in
15 diesem Fall die Konstrukte mit autoreguliertem Genschalter) zur Verfügung gestellt. β -Galaktosidase konnte durch eine Substratreaktion als blauer Niederschlag in einzelnen Zellen detektiert werden. Dadurch konnte eine Funktion der Vektorkonstrukte mit wesentlich höherer Sensitivität nachgewiesen werden.

- 20 A293 Zellen wurden wie im Beispiel 3 beschrieben mit folgenden Konstrukten transfiziert und anschließend teilweise mit Mifepriston stimuliert:

1. pCMVB (Positivkontrolle für lacZ, Vektor mit lacZ-Gen unter der Kontrolle eines CMV-Promoters)
2. 17x4/IL15/Oligo + pGene/V5-His/lacZ +/- Mifepriston (Negativkontrolle
25 ohne Genschalter)
3. 17x4/IL15/Oligo/GS + pGene/V5-His/lacZ +/- Mifepriston
4. 17x4/IL15/Oligo/IVS8/GS + pGene/V5-His/lacZ +/- Mifepriston

5. pcDNA3switch + pGene/V5-His/lacZ +/- Mifepriston (Positivkontrolle mit konstitutiv hohem Genschalter)

6. pGene/V5-His/lacZ –Mifepriston (Negativkontrolle ohne Genschalter)

Die Zellen wurden am dritten Tag nach der Transfektion für 10 min bei –20°C mit eiskaltem Methanol fixiert, 3x mit PBS gewaschen und anschließend für 2,5 h bei 37°C mit lacZ Färbelösung (60 µl von 400 mM Kaliumferricyanid, 60 µl von 400 mM Kaliumferrocyanid, 60 µl von 200 mM MgCl₂, 300 µl 20mg/ml X-Gal, 5,52 ml PBS) behandelt.

Die lichtmikroskopische Auswertung der transfizierten Zellen lieferte folgendes Ergebnis (Tab. 2):

Tabelle 2: Intensität der β-Galaktosidasefärbung von transient transfizierten A293 Zellen

| | Konstrukt | Kotransfektion mit pGene/V5-His/lacZ | Mifepriston-Zugabe | Ergebnis |
|---|-------------------------|--------------------------------------|--------------------|----------|
| 1 | pCMVβ | - | - | *** |
| 2 | 17x4/IL15/Oligo | + | - | (*) |
| | 17x4/IL15/Oligo | + | + | * |
| 3 | 17x4/IL15/Oligo/GS | + | - | (*) |
| | 17x4/IL15/Oligo/GS | + | + | *** |
| 4 | 17x4/IL15/Oligo/IVS8/GS | + | - | - |
| | 17x4/IL15/Oligo/IVS8/GS | + | + | *** |
| 5 | pcDNA3switch | + | - | *** |
| | pcDNA3switch | + | + | ***** |
| 6 | pGene/V5-His/lacZ | - | - | - |

*: Maß für Färbeintensität

Ohne Genschalter (2.) war keine signifikante Blaufärbung von Zellen zu beobachten. In Zellen, die mit autoreguliertem Genschalter transfiziert worden waren (3.+4.), bewirkte Mifepriston-Stimulierung eine deutliche Blaufärbung von 3-5 % der Zellen.

- 5 Da diese niedrige Zellanzahl eine MutIL-15/mFc-Menge produziert, die nur sehr gering ist, liegt sie unter der Nachweisgrenze des ELISA. Die lacZ Färbung jedoch kann die Genschalteraktivität auch in einzelnen Zellen erfassen und nachweisen.

Diese Experimente beweisen, dass der aktivierte Genschalter, der durch die Konstrukte 17x4/IL15/Oligo/GS und 17x4/IL15/Oligo/IVS8/GS nach
10 Stimulierung mit Mifepriston bereitgestellt wird, die Transkription von lacZ bewirken kann. Damit beweisen diese Daten die Funktionalität des autoregulierten Genschalters der oben genannten Konstrukte.

Beispiel 5: Herstellung und Charakterisierung transgener Mäuse

- 15 50 µg DNA der Konstrukte 17x4/IL15/Oligo/GS und 17x4/IL15/Oligo/IVS8/GS wurden mit den Restriktionsenzymen Eco47III und NotI geschnitten und die gewünschten Fragmente der Länge 4800 bp bzw. 4924 bp aufgereinigt. Anschließend wurden die Fragmente in die Vorkerne von C3HeB/FeJ Mäusen injiziert und die Embryonen anschließend in scheinchwangere Weibchen
20 implantiert. Von den erhaltenen Mäusen wurde die genomische DNA extrahiert und mit Hilfe von PCR-Analyse auf die Integration des Transgens untersucht. Für die PCR-Analyse wurden folgende Primer verwendet: GS-IL15FW.2 (5'- TAT GGC TTC TGA GGC GGA AAG AAC CAG C - 3') und GS-L15 RV.3 (5'- G CAG AGA CCC CAT GGG CAT GGT GGC TAG -3'). Die erhaltenen PCR-
25 Produkte haben dementsprechend eine Länge von 211 bp (ohne Intron) bzw. 335 bp (mit Intron IVS8).

Von 44 erhaltenen Mäusen der Oocyteninjektion des Konstruktes 17x4/IL15/Oligo/GS waren 16 Tiere transgen (36%).

Die Founder-Tiere (F0 Generation) wurden mit Wildtyp-DBA/2 Mäusen verpaart und die erhaltene F1-Nachkommen wiederum auf genomische Präsenz des Transgens untersucht. Die transgenen F1 Tiere wurden anschließend auf regulierte Expression von MutIL-15/mFc untersucht. Im Alter von ca. 8-16 Wochen wurde
5 den Tieren 250 µg/kg in Sesamöl gelöstes Mifepriston (Sigma, Deisenhofen M 8046) jeden zweiten Tag insgesamt dreimal intraperitoneal injiziert. Einen Tag nach der letzten Injektion wurden die Tiere getötet und aus den Geweben RNA bzw. Protein extrahiert. Anschließend wurde die Expression von Genschalterprotein bzw. Immunmodulator in den Geweben mit Hilfe von ELISA
10 und Western Blot analysiert. Die RNA-Menge wird mittels einer quantitativen Reverse-Transkription PCR (RT-PCR) bestimmt, um die Menge an transkribiertem Genschalter bzw. Immunmodulator zu ermitteln.

Je 1 µg RNA werden mit Hilfe der Expand Reverse Transcriptase (Roche, Mannheim) nach Anleitung des Herstellers in cDNA transkribiert. Anschließend
15 wird die Expression des Genschalters bzw. des Immunmodulators MutIL15/mFc mit Hilfe des Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green Kits (Roche, Mannheim) quantitativ untersucht. Die PCR Bedingungen für die Detektion des Immunmodulators sind wie folgt:

Denaturierung: 95°C, 600 sec

20 Zyklen: 95°C 15 sec, 60°C 5 sec, 72 °C 10 sec.

Primer CD5.6-FW: 5'-CCTGCTGGGGATGCTGGTC

Primer CD5.6-RV: 5'-TTTCCTCCAGTTCCTCACATTC

MgCl₂: 3 mM

Die PCR Bedingungen für die Detektion des Genschalters sind wie folgt:

25 Denaturierung: 95°C, 600 sec

Zyklen: 95°C 15 sec, 53°C 5 sec, 72 °C 10 sec.

Primer GS-FW: 5'-GACTTAAAAAGCTCAAGTGCTCCAAAG

Primer GS-RV: 5'-TATATCCTGTAAAGAATCCAT

MgCl₂: 3 mM

Außerdem wird den Tieren in regelmäßigen Abständen vor bzw. während der Mifepriston-Behandlung Blut entnommen und die darin enthaltenen MutIL-15/mFc Menge über ELISA bestimmt.

- 5 Zum Vergleich dienen gleichaltrige Mäuse derselben transgenen Linie, die zuvor nicht mit Mifepriston behandelt worden waren.

Alternativ werden die transgenen Mäuse in einem Zwei-Schritt-Verfahren hergestellt. Zuerst werden zwei verschiedene Linien transgener Mäuse generiert,
10 die entweder lediglich das Genschaltermolekül (Linien „A“) oder nur den durch die Genschalterbindungsstelle regulierten Immunmodulator (Linien „B“) exprimieren. Von den erhaltenen transgenen Mäusestämmen der A-Linien werden diejenigen Tiere ausgewählt, die geeignete Mengen Genschaltermolekül exprimieren und in einem zweiten Schritt mit transgenen Tieren der B-Linien
15 verpaart. Die erhaltenen Nachkommen werden danach auf simultane Expression der beiden Transgene untersucht. Auf diese Weise werden doppelt transgenen Linien „A/B“ erhalten, die durch Genschaltermoleüle regulierten Immunmodulator exprimieren.

50 µg DNA der Konstrukte pswitch (für Linien „A“) bzw. 17x4/IL15/Oligo und
20 17x4/IL15/Oligo/IVS8 (für Linien „B“) werden mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten und die gewünschten Fragmente aufgereinigt. Anschließend werden die Fragmente in die Vorkerne von C3HeB/FeJ Mäusen injiziert und die Embryonen anschließend in scheinschwangere Weibchen implantiert. Von den erhaltenen Mäusen wird die genomische DNA extrahiert und
25 mit Hilfe von PCR-Analyse auf die Integration des Transgens untersucht.

Beispiel 6: Transplantation von Inseln aus Spenderorganen transgener Mäuse

Bei der Inseltransplantation werden Inseln, die aus Pankreata von Mäusen isoliert
30 werden, unter die Nierenkapsel von diabetischen Mäusen injiziert (Ferrari-Lacraz et al., The Journal of Immunology, 2001, Vol.167 S. 3478-3485). Spender-Inseln

werden aus transgenen Mäusen des Stammes DBA/2J isoliert, die MutIL-15/mFc unter Kontrolle des Genschalters exprimieren. Die Spender-Mäuse werden mit Mifepriston (250 µg/kg) vorbehandelt, so dass sie am Tag der Organentnahme nachweisbar MutIL-15/mFc produzieren. Zur Präparation der Inseln werden
5 Donor Pankreata in situ mit Typ IV Collagenase (2 mg/ml; Worthington Biochemical Corp.) perfundiert. Nach 30 Minuten Verdau bei 37 °C werden die Inseln über einen diskontinuierlichen Ficoll-Gradienten aufgereinigt und anschließend in RPMI1640 Medium (Gibco, Karlsruhe) mit 5,6 mM Glucose kultiviert. Anschließend werden 300-400 Inseln unter die Nierenkapsel des
10 Empfängers transplantiert.

Der Empfänger ist eine 6-10 Wochen alte nicht transgene B6AF1 Maus, bei der durch intraperitoneale Injektion des Betazelltoxins Streptozotocin (225 mg/kg; Sigma, Deisenhofen) Diabetes induziert wurde. Als Kontrolle werden syngene
15 Inseln (d.h., Inseln von B6AF1-Mäusen) in die diabetischen Mäuse transplantiert. Pankreatische Inseln werden aseptisch unter die linke Nierenkapsel transplantiert. Dazu wird die Maus narkotisiert und ein Einschnitt unter dem linken Rippenbogen durchgeführt. Die linke Niere wird aus dem Bauchraum herausmobilisiert und der untere Pol der Nierenkapsel kurz eingeschnitten. Mit
20 einer stumpfen sterilen Kanüle wird eine Tasche unter der Nierenkapsel geformt. Die Inseln werden anschließend mit einer sterilen Pipettenspitze in diesen Hohlraum injiziert. Danach wird die Niere in den Bauchraum zurückgelegt und das Abdomen geschlossen. Die Empfängertiere werden ab dem Transplantationstag jeden zweiten Tag mit Mifepriston 250 µg/kg behandelt, so
25 dass sie kontinuierlich MutIL-15/mFc produzieren.

Die Funktion des Allotransplantats wird über regelmäßige Blutglukosemessungen (Accu-Check III; Boehringer Mannheim, Mannheim) verfolgt. Vor und nach der Diabetesinduktion sowie nach der Inseltransplantation wird den Tieren
30 regelmäßig Blut aus der Schwanzvene bzw. dem retrobulbären Venenplexus entnommen und der Blutzuckerspiegel bestimmt. Zusätzliche Kontrollen

zwischen den Blutabnahmen finden mit Urinteststreifen statt. Die primäre Transplantatfunktion wird als Blutzuckergehalt unter 11,1mmol/l (200 mg/dl) an Tag 3-5 nach der Transplantation definiert. Das Transplantat gilt als abgestoßen, wenn der Blutzuckerspiegel an mindestens zwei aufeinanderfolgenden Tagen auf
5 über 500 mg/dl angestiegen ist, nachdem man eine primäre Transplantatfunktion beobachtet.

Als Kontrolle werden Inseltransplantationen durchgeführt, bei denen die Tiere entweder kein Mifepriston erhalten und somit auch kein Genschalter-reguliertes MutIL-15/mFc exprimieren oder bei denen die Tiere die mit externer Zugabe von
10 MutIL-15/mFc behandelt werden.

Die Tiere, die auf die beschriebene Weise behandelt werden, können nach der Transplantation von Inselzellen, die aus transgenen Spendermäusen gewonnen werden, ihren Blutzuckerspiegel besser regulieren und zeigen bei Behandlung mit Mifepriston eine verminderte Abstoßung der Zelltransplantate.

15

Beispiel 7: Heterotope Herztransplantation

Bei der heterotopen Herztransplantation wird das Spenderherz mit den großen Gefäßen im Abdomen des Empfängers verbunden (Ono et al., J. Cardiovasc. Surg. 1969, Corry et al., Transplantation 1973). Spenderherzen werden aus transgenen
20 Mäusen des Stammes DBA/2J isoliert, die MutIL-15/mFc unter Kontrolle des Genschalters exprimieren. Die Spender-Mäuse werden mit Mifepriston (250 µg/kg) vorbehandelt, so dass sie am Tag der Organentnahme nachweisbar MutIL-15/mFc produzieren. Bei den anästhesierten Mäusen wird die Vena cava isoliert und Heparin (400 U/kg) zur Verteilung über den gesamten Kreislauf injiziert.
25 Anschließend werden die Tiere durch Teilung der abdominalen Gefäße ausgeblutet und das Herz mit Hilfe einer medianen Sternotomie freigelegt. Die Aorta und die pulmonaren Gefäße werden isoliert und geteilt und die pulmonären Venen und die Vena cava en masse mit 4-10 Tevdek (Deknata, Queens Village) ligiert. Das Herz wird unmittelbar nach seiner Entnahme bei 4 °C in
30 physiologischer Kochsalzlösung (Physiolosol, Abbot Laboratories, Illinois, USA) aufbewahrt. Die Vena cava inferior und Aorta abdominalis des Empfängers (6-8

Wochen alte nicht transgene B6AF1 Maus) werden freipräpariert und die Gefäße mit locker liegenden Gefäßklammern versehen. Das Ende der Spender-Aorta wird mit der Seite der Empfänger-Aorta abdominalis mit einem 8-0 Prolen-Faden verbunden. Die A. pulmonalis des Spenders wird mit der Vena cava des Empfängers auf die gleiche Weise fusioniert. Die Gefäßklammern werden entfernt und das Spender-Herz mit 37 °C warmer Ringer's Laktatlösung erwärmt, so dass spontan die Herzkontraktion wieder einsetzt. Die Empfängertiere werden ab dem Transplantationstag jeden zweiten Tag mit Mifepriston 250 µg/kg behandelt, so dass sie kontinuierlich MutIL-15/mFc produzieren. Das Überleben des Transplantats wird jeden zweiten Tag durch Abtasten des schlagenden Herzens durch die Bauchwand überprüft und auf einer Skala von 1+ bis 4+ anhand der Impuls-Stärke und -Rate bewertet. Das Herz gilt als abgestoßen, wenn keine Herzmuskelkontraktionen mehr fühlbar sind. Eine Verhinderung der Abstoßung wird erzielt, wenn die Spender-Herzen über einen längeren Zeitraum schlagen als Herzen in unbehandelten Kontrolltieren. Als Kontrolle werden Herztransplantationen durchgeführt, bei denen die Tiere entweder kein Mifepriston erhalten und somit auch kein Genschalter-reguliertes MutIL-15/mFc exprimieren oder bei denen die Tiere die mit externer Zugabe von MutIL-15/mFc behandelt werden.

Dieses Beispiel zeigt, dass die heterotopen Herztransplantate in denjenigen Tieren, die mit Mifepriston behandelt werden, im Vergleich zu den unbehandelten Tieren länger funktionsfähig bleiben.

Beispiel 8: Herstellung transgener ES-Zelllinien

100 µg DNA der Konstrukte 17x4/IL15/Oligo/RIPnh/GS, 17x4/IL15/Oligo/RIPhn/GS, 17x4/IL15/Oligo/RIPhn/TVS8/GS und 17x4/IL15/Oligo/RIPnh/TVS8/GS wurden mit den Restriktionsenzymen Eco47III und NotI geschnitten, die Fragmente aufgereinigt und in mindestens 100 µl sterilem PBS resuspendiert. Anschließend wurden die Konstrukte 17x4/IL15/Oligo/RIPhn/GS und 17x4/IL15/Oligo/RIPhn/TVS8/GS durch Elektroporation in Maus-ES-Zellen der Linie SVJ129 oder R1 eingebracht. Dazu

wurden exponentiell wachsende Maus-ES Zellen trypsiniert, vereinzelt und gezählt. Ca. 3×10^7 Zellen wurden zweimal mit 5-10 ml kaltem PBS gewaschen und danach das Zellpellet in kaltem PBS aufgenommen, so dass das Endvolumen inklusive DNA 800 μ l beträgt. Anschließend wurde die verdaut DNA zu den
5 Zellen gegeben, die Lösung gemischt und mindestens 10 Minuten auf Eis inkubiert. Unter der Sterilbank wurde das Zell/DNA-Gemisch in vorgekühlte Elektroporationsküvetten mit einem Elektrodenspalt von 0,4 cm (BioRad, München) eingefüllt. Die Elektroporation wurde mit einem Genepulser-2 Gerät (BioRad, München) bei 0,8 kV und 3 μ F durchgeführt. Anschließend wurden die
10 Zellen mit ES-Zellmedium (DMEM mit 20 mM Hepes, 15 % hitzeinaktiviertes FCS, 50 U/ml Penicillin, 50 μ g/ml Streptomycin, 0,1 mM nichtessentielle Aminosäuren, 0,1 mM Mercaptoethanol, 10^3 U/ml Leukemia Inhibitory Factor) gemischt und gleichmäßig auf zehn mit 0,1 % Gelatine beschichtete 10 cm Zellkulturschalen verteilt. Am nächsten Tag wurde die Selektion durch Zugabe
15 von 200 μ g/ ml Hygromycin (Sigma, Deisenhofen H 3274) in ES-Zellmedium begonnen. Die Zellen wurden für ca. 5-9 Tage auf Aufnahme des Konstruktes selektioniert und einzelne transgene Klone unter der Sterilbank von Hand isoliert und auf 96-Lochplatten überführt. Die Zellen wurden vor Erreichen der Konfluenz passagiert und sukzessive auf 48-Lochplatten, 24-Lochplatten, 6 Loch-Platten und
20 10 cm-Schalen umgesetzt.

Die Zellklone wurden nach Zugabe von 10 nM Mifepriston auf regulierbare Expression des Genschalters und MutIL-15/mFc mittels quantitativer RT-PCR bzw. von MutIL-15/mFc mit Hilfe von ELISA und Western Blot Assays (wie oben in Beispiel 3 und 4 beschrieben) untersucht.

25 Alternativ werden die transgenen ES-Zellen in einem 2-Schritt-Verfahren hergestellt. Zuerst werden transgene ES-Zellen generiert, die lediglich das Genschaltermolekül reguliert exprimieren. Von den erhaltenen transgenen Zelllinien werden diejenigen Klone ausgewählt, die geeignete Mengen Genschaltermolekül exprimieren. In einem zweiten Schritt werden diese Klone
30 mit DNA-Konstrukten, die den durch eine Genschalterbindungsstelle regulierten Immunmodulator kodieren, supertransfiziert. Die erhaltenen doppelt-transgenen

Linien werden wie in Beispiel 5 beschrieben durch RT-PCR auf simultane Expression der beiden Transgene untersucht. Auf diese Weise werden doppelt transgenen ES-Zellen erhalten, die durch Genschaltermoleküle regulierten Immunmodulator exprimieren.

- 5 100 µg DNA des Genschalter-Konstruktes werden mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten, das gewünschte Fragment aufgereinigt, in sterilem PBS resuspendiert und wie oben beschrieben durch Elektroporation in ES-Zellen eingebracht. Da das Konstrukt eine Resistenz gegen das Antibiotikum Zeocin vermittelt, können die Zellen durch Behandlung mit diesem Antibiotikum
- 10 auf erfolgreiche Transfektion selektioniert werden. Von den erhaltenen Zellen werden transgene Klone isoliert und die Expression des Genschaltermoleküls in Abhängigkeit von Mifepriston-Zugabe durch quantitative RT-PCR untersucht. Diejenigen Klone, die geeignete Mengen des Genschaltermoleküls exprimieren, werden in einem zweiten Schritt durch erneute Elektroporation mit aufgereinigten
- 15 Eco47III/NotI-Fragmenten der Konstrukte 17x4/IL15/Oligo/RIPhn und 17x4/IL15/Oligo/RIPhn/IVS8 super-transfiziert und durch Hygromycin-Behandlung auf Aufnahme des zweiten Transgens selektioniert. Die simultane Integration beider Transgene wird mittels PCR-Analyse der genomischen DNA überprüft.
- 20 Die erhaltenen doppelt-transgenen Zellklone werden nach Zugabe von 10 nM Mifepriston auf regulierbare Expression des Genschalters und MutIL-15/mFc mittels quantitativer RT-PCR bzw. von MutIL-15/mFc-Protein mit Hilfe von ELISA und Western Blot Assays wie bereits oben in Beispiel 5 beschrieben untersucht. Anschließend werden von den erhaltenen Zelllinien diejenigen Klone
- 25 ausgewählt, die nur nach Zugabe von Mifepriston den Immunmodulator MutIL-15/mFc in ausreichenden Mengen herstellen und sezernieren.

Beispiel 9: Transplantation von Insulin-produzierenden Zellen, die aus transgenen ES-Zellen hergestellt werden

- 30 Vor der Transplantation werden aus undifferenzierten Hygromycin-resistenten ES-Zellklonen Insulin-produzierende Zellen hergestellt, die unter der Kontrolle des

Genschalters MutIL-15/mFc exprimieren Soria et al. (Diabetes. 2000 Feb.; 49 (2): 157-62.

Die Insulin-produzierenden Zellen werden vor der Transplantation mit Mifepriston behandelt, so dass sie ausreichende Mengen MutIL-15/mFc produzieren.

- 5 Anschließend werden 1 Mio Insulin-produzierende Zellen in durch Streptozotocin-Behandlung diabetische C57BL/6 Mäuse entweder unter die Nierenkapsel (wie in Beispiel 7 beschrieben) oder in die Milz (Soria et al. (Diabetes. 2000 Feb.; 49 (2): 157-62) injiziert. Die Empfängertiere werden ab dem Transplantationstag jeden zweiten Tag mit Mifepriston (250 µg/kg) behandelt, so dass sie kontinuierlich
- 10 MutIL-15/mFc produzieren.

- Die Funktion des Allotransplantats wird über regelmäßige Blutglukosemessungen (Accu-Check III; Boehringer Mannheim, Mannheim) verfolgt. Die primäre Transplantatfunktion wird als Blutzuckergehalt unter 11,1mmol/l (200 mg/dl) an Tag 3-5 nach der Transplantation definiert. Das Transplantat gilt als abgestoßen,
- 15 wenn der Blutzuckerspiegel an mindestens zwei aufeinanderfolgenden Tagen auf über 500 mg/dl ansteigt, wenn zuvor eine primäre Transplantatfunktion beobachtet wird.

- Als Kontrolle werden Insulin-produzierende Zellen in Empfänger-Tiere
- 20 transplantiert, die aus dem gleichen Zellklon hergestellt wurden, aber nicht mit Mifepriston vorbehandelt sind und somit auch kein Genschalter-reguliertes MutIL-15/mFc exprimieren. Alternativ können auch Insulin-produzierende Zellen verwendet werden, die zwar das MutIL-15/mFc-Konstrukt, nicht aber den Genschalter enthalten

- 25 Weiterhin dienen Tiere als Kontrolle, die nach Erhalt von aus Stammzellen abgeleiteten Insulin-produzierenden Zellen mit externer Zugabe von MutIL-15/mFc behandelt werden.

- 30 Untersuchungen des Blutzuckerspiegels von Tieren, die aus Stammzellen hergestellte Insulin-produzierende Zellen erhalten haben, zeigen, dass

- 64 -

Zelltransplantate in mit Mifepriston behandelten Tieren längere Zeit funktionell aktiv sind.

Patentansprüche

- 5 1. Humane oder tierische nicht-totipotente Zelle enthaltend mindestens eine Nukleinsäure kodierend für mindestens einen Immunmodulator unter der Kontrolle eines durch Zugabe einer Wirksubstanz regulierbaren Genexpressionssystems.
- 10 2. Zelle nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Zelle um eine Stammzelle, eine Vorläuferzelle und/oder eine immortalisierte Zelle handelt.
- 15 3. Zelle nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine pluripotente oder multipotente embryonale, fötale, neonatale oder adulte Stammzelle handelt.
- 20 4. Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3 in Form einer Zelllinie.
5. Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, dass das regulierbare Genexpressionssystem ein Progesteron-Genexpressionssystem, ein Tetracyclin-Expressionssystem und/oder ein Rapamycin-Genexpressionssystem ist.
- 25 6. Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, dass der Immunmodulator mindestens eine der folgenden funktionellen Eigenschaften aufweist:
 - a. die Inhibierung einer Antigenerkennung, die durch T-Zellen
 - 30 vermittelt wird

- 66 -

- b. die Inhibierung eines über einen Rezeptor auf einer T-Zelle vermittelten Signals,
- c. die Aktivierung eines über einen Rezeptor auf einer T-Zelle vermittelten Signals,
- 5 d. die Inhibierung des Wachstums von T-Zellen,
- e. die Inhibierung von Molekülen die das Überleben von T-Zellen unterstützen
- f. die Inhibierung von Effektormolekülen von T-Zellen(wie TNF-alpha, IFN-gamma),
- 10 g. die Inhibierung der Adhäsion von T-Zellen,
- h. die Inhibierung einer T-Zell-kostimulatorischen Interaktion (die Aktivierung eines Lymphozyten erfolgt über zwei Signale: zum einen erfolgt eine Stimulierung über den Antigenrezeptor, zum anderen erfolgt ein weiteres Signal zur klonalen Expansion und Differenzierung eines ungeprägten Lymphozyten; diese kostimulatorische Interaktion kann
- 15 durch einen Immunmodulator inhibiert werden)
- i. die Inhibierung der Aktivierung, der Proliferation, des Überlebens, der Antigenpräsentation, des Signalisierens, und/oder der Effektorfunktionen von weiteren Zellen, die an einer Immunantwort
- 20 beteiligt sind, wie z.B. allgemeine und spezielle antigenpräsentierende Zellen, insbesondere z.B. dendritische Zellen und Monozyten/Makrophagen B-Zellen, neutrophile Granulozyten und NK Zellen die Inhibierung der zellulären Interaktion von unterschiedlichen Zellen, entweder über Oberflächenrezeptoren oder über sekretierte
- 25 Moleküle, wie z.B. Zytokine, Chemokine oder Wachstumsfaktoren, die an einer Immunantwort beteiligt sind, wie z.B. allgemeine und spezielle antigenpräsentierende Zellen, insbesondere z.B. dendritische Zellen und Monozyten/Makrophagen, T-Zellen, B-Zellen, neutrophile Granulozyten und NK Zellen,

- 5 j. die Inhibierung der Migration von Zellen, die an einer Immunantwort beteiligt sind, wie z.B. spezielle antigenpräsentierende Zellen, insbesondere z.B. dendritische Zellen und Monozyten/Makrophagen, T-Zellen, B-Zellen, neutrophile Granulozyten und NK Zellen,
- k. die Inhibierung von Komponenten des Komplementsystems
- 10 l. die Inhibierung von phagozytotischen Aktivitäten im Zusammenhang mit der Präsentation von Fremd- oder Autoimmunantigenen, oder durch die Bindung von Antikörpern an Antigene, und/oder
- m. die Inhibierung von Entzündungsreaktionen.
- 15 7. Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Immunmodulator ein Antikörper ist.
8. Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Immunmodulator
- d. ein Rezeptor ist
- e. ein löslicher sekretierter Rezeptor ist
- 20 f. ein sekretiertes Protein oder Peptid ist
9. Zelle nach Anspruch 8, wobei der Immunmodulator ein Fusionsprotein ist aus einem mutierten IL 15 und einem Fc-Fragment, wobei das Fc-Fragment an den C-Terminus des mutierten IL 15 Moleküls, bevorzugt
- 25 über die Hinge-Region, fusioniert ist.
10. Zelle nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Fc-Fragment des Antikörpers ein solches von einem IgG, insbesondere ein humanes IgG1,

IgG2, IgG3, IgG4 oder ein analoges Säugetier IgG oder ein IgM, insbesondere ein humanes IgM oder ein analoges Säugetier IgM ist.

- 5 11. Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure zusätzlich eine Selektionskassette, insbesondere ein geeignetes Transfektions-Markergen und/oder Differenzierungs-Markergen, kodiert.
- 10 12. Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure zusätzlich ein Molekül kodiert, das NK-Zellen- und/oder Killerzellen inhibiert.
- 15 13. Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 1-11, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure zusätzlich ein Molekül kodiert, dass
- a. Dendritische Zellen inhibiert
 - b. Monocyten und oder Makrophagen inhibiert
 - c. B-Zellen inhibiert

20 d. Polmorphnukleäre Zellen, z.B. Neutrophile Granulozyten inhibiert
14. Zelle nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass das genannte inhibierende Molekül ein humanes MHC-Klasse-I-Molekül, ein chimeres MHC-Klasse-I-Molekül oder ein virales MHC-Klasse-I-Homolog ist.
- 25 15. Nukleinsäure kodierend für mindestens einen Immunmodulator und mindestens ein durch Zugabe einer Wirksubstanz regulierbares Genexpressionssystem.
- 30 16. Vektor enthaltender mindestens einen Nukleinsäure nach Anspruch 15.

17. Arzneimittel, enthaltend mindestens eine Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 14 und geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe.
18. Humanes oder tierisches organspezifisches Gewebe und/oder humanes oder tierisches Säugetierorgan, enthaltend mindestens eine Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 14.
19. Transgenes nicht-humanes Säugetier, enthaltend mindestens eine Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 14.
20. Verwendung einer Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 14 und/oder eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines humanen oder tierischen Säugetierorgans nach Anspruch 18 zur Transplantation in ein humanes oder tierisches Säugetier.
21. Verwendung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine Allo-, Auto- oder Xenotransplantation handelt.
22. Verwendung einer Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 14, einer Nukleinsäure nach Anspruch 15, eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines humanen oder tierischen Säugetierorgans nach Anspruch 18 zur Herstellung eines Medikamentes zur Inhibierung einer Transplantatabstoßungsreaktion in einem humanen oder tierischen Säugetier, gegebenenfalls in Anwesenheit mindestens eines Immunmodulators.
23. Verwendung einer Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 14, einer Nukleinsäure nach Anspruch 15, eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines humanen oder tierischen Säugetierorgans nach Anspruch 18 zur Herstellung eines Medikamentes

- 70 -

zur Prophylaxe und/oder Therapie von
Transplantationsfolgeerkrankungen und/oder Autoimmunerkrankungen.

24. Verfahren zur Herstellung einer Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 14
5 enthaltend folgende Schritte:
- c. Einbringen mindestens einer Nukleinsäure nach Anspruch 15
 und/oder mindestens eines Vektors nach Anspruch 16 in eine
 transplantierbare humane oder tierische nicht-totipotente Zelle, und
- d. Expression der Nukleinsäure unter Zugabe mindestens einer
10 geeigneten Wirksubstanz zur Regulierung des Genschalters.
25. *In vitro*-Verfahren zur Herstellung eines humanen oder tierischen
 organspezifischen Gewebes und/oder humanen oder tierischen
 Säugetierorgans nach Anspruch 18, enthaltend die folgenden Schritte:
- 15 e. Einbringen sowohl mindestens einer Nukleinsäure nach Anspruch
 15 und/oder mindestens eines Vektors nach Anspruch 16 und als auch
 mindestens eines Differenzierungs-Markergens in mindestens eine nicht-
 totipotente Stammzelle, eine nicht-totipotente Vorläuferzelle und/oder eine
 nicht-totipotente immortalisierte Zelle,
- 20 f. Differenzierung der Zelle aus Schritt a.,
 g. Selektionieren der differenzierten Zelle aus Schritt b. und
 h. Einbringen der selektierten Zelle aus Schritt c. in ein humanes oder
 tierisches organspezifischen Gewebes und/oder in ein humanes oder
 tierisches Säugetierorgan.
- 25
26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass nach, vor oder
 gleichzeitig mit Schritt a. mindestens ein geeignetes Transfektions-
 Markergen in mindestens eine nicht-totipotente Stammzelle, eine nicht-
 totipotente Vorläuferzelle und/oder eine nicht-totipotente immortalisierte
30 Zelle eingebracht wird und nach Schritt a. vorzugsweise die transfektierte
 Zelle aus Schritt a. selektioniert wird.

27. Verfahren nach einem der Ansprüche 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine pluripotente oder multipotente embryonale, fötale, neonatale oder adulte Stammzelle handelt.
- 5
28. Verfahren zur Erzeugung eines transgenen nicht-humanen Säugetiers nach Anspruch 18, enthaltend folgende Schritte:
- f. Einbringen sowohl mindestens einer Nukleinsäure nach Anspruch 15 und/oder mindestens eines Vektors nach Anspruch 16 als auch
- 10 mindestens eines geeigneten Transfektions-Markergens in mindestens eine Oocyte, Stammzelle, eine Vorläuferzelle und/oder eine immortalisierte Zelle eines nicht-humanen Säugetieres,
- g. Selektionieren der transfizierten Zelle aus Schritt a.,
- h. Einbringen der nach Schritt b. selektierten Zelle in mindestens eine
- 15 nicht-humane Säugetier-Blastozyste,
- i. Einbringen der Blastozyste aus Schritt c. in eine nicht-humane Säugetier-Pflegemutter und
- j. Identifizierung des sich aus genannter Blastozyste entwickelten transgenen nicht-humanen Säugetiers.
- 20
29. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine pluripotente oder multipotente embryonale, fötale, neonatale oder adulte Stammzelle handelt.
- 25
30. Verfahren zur Erzeugung eines transgenen nicht-humanen Säugetiers nach Anspruch 19, enthaltend folgende Schritte:
- d. Einbringen sowohl mindestens einer Nukleinsäure nach Anspruch 15 und/oder mindestens eines Vektors nach Anspruch 16 als auch
- 30 mindestens eines geeigneten Transfektions-Markergens in einen der beiden Vorkerne einer befruchteten nicht-humanen Säugetier-Oocyte,

- e. Einbringen der Säugetier-Oocyte aus Schritt a. in eine nicht-humane Säugetier-Pflegemutter und
- f. Identifizierung des sich aus genannter Säugetier-Oocyte entwickelten transgenen nicht-humanen Säugetiers.

5

- 31. Transgenes nicht-humanes Säugetier, dadurch gekennzeichnet, dass es nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 28 oder 29 erzeugt wurde.
- 32. Transgenes nicht-humanes Säugetier, dadurch gekennzeichnet, dass es ein Nachkomme des Säugetieres nach Anspruch 30 ist.
- 33. Verwendung eines transgenen nicht-humanen Säugetiers nach einem der Ansprüche 19, 30 oder 31 zur Gewinnung einer nicht-humanen Zelle, eines nicht-humanen organspezifischen Gewebes und/oder eines nicht-humanen Säugetierorgans für die Allo- und/oder Xenotransplantation.
- 34. Verwendung eines transgenen nicht-humanen Säugetiers nach einem der Ansprüche 19, 30 oder 31, eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines humanen oder tierischen Säugetierorgans nach Anspruch 18 zum Auffinden von pharmakologisch aktiven Wirkstoffen und/oder zur Identifizierung von toxischen Substanzen.

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/CN/00665

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/12 C12N15/62 C12N15/63 C12N5/06 C12N5/08
 C12N5/10 A01K67/027 A61K35/34 A61K35/39 C07K14/705
 C07K14/54 C07K16/46 C07K16/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-------------------------------|
| X | US 5 912 411 A (BUJARD HERMANN ET AL) 15 June 1999 (1999-06-15) | 1-8, 11-34 |
| Y | column 37 -column 42 | 9,10 |
| X | US 5 733 727 A (FIELD LOREN J) 31 March 1998 (1998-03-31) | 1,2,4,6, 8,11-13, 15-24 |
| X | example 5 | 3,5 |
| X | KOH GOU YOUNG ET AL: "Targeted expression of transforming growth factor-beta-1 in intracardiac grafts promotes vascular endothelial cell DNA synthesis" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 95, no. 1, 1995, pages 114-121, XP008031081 ISSN: 0021-9738 | 1,2,4,6, 8,11-13, 15-24 |
| X | the whole document | 5 |
| | --- -/- | |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 May 2004

Date of mailing of the international search report

22/06/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Madruga, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/CH 03/00665

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 20, 21, 28, 29, 30, 33 and 34 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the stated effects of the compound or composition.
2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

see additional sheet
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/CH/00665

| Patent document cited in search report | | Publication date | | Patent family member(s) | | Publication date |
|---|---|---------------------|----|----------------------------|--|---------------------|
| US 5912411 | A | 15-06-1999 | US | 5789156 A | | 04-08-1998 |
| | | | US | 5654168 A | | 05-08-1997 |
| | | | US | 5650298 A | | 22-07-1997 |
| | | | US | 5464758 A | | 07-11-1995 |
| | | | US | 6242667 B1 | | 05-06-2001 |
| | | | US | 2002152489 A1 | | 17-10-2002 |
| | | | AU | 3092395 A | | 25-01-1996 |
| | | | AU | 4456699 A | | 25-11-1999 |
| | | | CA | 2193122 A1 | | 18-01-1996 |
| | | | CN | 1167504 A | | 10-12-1997 |
| | | | DE | 804565 T1 | | 04-05-2000 |
| | | | EP | 1092771 A2 | | 18-04-2001 |
| | | | EP | 0804565 A1 | | 05-11-1997 |
| | | | ES | 2139552 T1 | | 16-02-2000 |
| | | | FI | 965287 A | | 28-02-1997 |
| | | | JP | 11506901 T | | 22-06-1999 |
| | | | NO | 965623 A | | 28-02-1997 |
| | | | WO | 9601313 A1 | | 18-01-1996 |
| | | | US | 6136954 A | | 24-10-2000 |
| | | | US | 2004003417 A1 | | 01-01-2004 |
| | | | US | 6004941 A | | 21-12-1999 |
| | | | US | 5589362 A | | 31-12-1996 |
| | | | US | 5814618 A | | 29-09-1998 |
| | | | US | 5866755 A | | 02-02-1999 |
| | | | US | 6271348 B1 | | 07-08-2001 |
| | | | US | 2003022315 A1 | | 30-01-2003 |
| | | | US | 6252136 B1 | | 26-06-2001 |
| | | | US | 2002077307 A1 | | 20-06-2002 |
| | | | US | 5888981 A | | 30-03-1999 |
| | | | US | 5859310 A | | 12-01-1999 |
| | | | US | 2002086426 A1 | | 04-07-2002 |
| | | | US | 2002152487 A1 | | 17-10-2002 |
| | | | US | 5922927 A | | 13-07-1999 |
| | | | AU | 684524 B2 | | 18-12-1997 |
| | | | AU | 7108194 A | | 03-01-1995 |
| | | | CA | 2165162 A1 | | 22-12-1994 |
| | | | DE | 705334 T1 | | 30-12-1999 |
| | | | EP | 0705334 A1 | | 10-04-1996 |
| | | | ES | 2140359 T1 | | 01-03-2000 |
| | | | JP | 9500526 T | | 21-01-1997 |
| | | | WO | 9429442 A2 | | 22-12-1994 |
| US 5733727 | A | 31-03-1998 | US | 5602301 A | | 11-02-1997 |
| | | | US | 6399300 B1 | | 04-06-2002 |
| | | | US | RE37978 E1 | | 04-02-2003 |
| | | | US | 2001038837 A1 | | 08-11-2001 |
| | | | US | 2002061295 A1 | | 23-05-2002 |
| | | | US | 6015671 A | | 18-01-2000 |
| | | | AU | 688427 B2 | | 12-03-1998 |
| | | | AU | 1097695 A | | 06-06-1995 |
| | | | AU | 697666 B2 | | 15-10-1998 |
| | | | AU | 5214198 A | | 19-03-1998 |
| | | | CA | 2174860 A1 | | 26-05-1995 |
| | | | EP | 0729506 A1 | | 04-09-1996 |
| | | | JP | 9505471 T | | 03-06-1997 |
| | | | WO | 9514079 A1 | | 26-05-1995 |
| WO 0187330 | A | 22-11-2001 | AU | 6158501 A | | 26-11-2001 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/CH/00665

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/12 C12N15/62 C12N15/63 C12N5/06 C12N5/08
C12N5/10 A01K67/027 A61K35/34 A61K35/39 C07K14/705
C07K14/54 C07K16/46 C07K16/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|-------------------------------|
| X | US 5 912 411 A (BUJARD HERMANN ET AL) 15. Juni 1999 (1999-06-15) | 1-8, 11-34 |
| Y | Spalte 37 -Spalte 42 | 9,10 |
| X | US 5 733 727 A (FIELD LOREN J) 31. März 1998 (1998-03-31) | 1,2,4,6, 8,11-13, 15-24 |
| X | Beispiel 5 | 3,5 |
| X | KOH GOU YOUNG ET AL: "Targeted expression of transforming growth factor-beta-1 in intracardiac grafts promotes vascular endothelial cell DNA synthesis" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, Bd. 95, Nr. 1, 1995, Seiten 114-121, XP008031081 ISSN: 0021-9738 | 1,2,4,6, 8,11-13, 15-24 |
| X | das ganze Dokument | 5 |

-/-

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. Mai 2004

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

22/06/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Madruga, J

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. —
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Obwohl die Ansprüche 20,21,28,29,30,33,34 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☒ Ansprüche Nr. —
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr. —
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. —
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt: —

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur Patentfamilie gehören

Internationales Akdenzeichen

PCT/CH 00665

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|---|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| US 5912411 | A | 15-06-1999 | US 5789156 A | 04-08-1998 |
| | | | US 5654168 A | 05-08-1997 |
| | | | US 5650298 A | 22-07-1997 |
| | | | US 5464758 A | 07-11-1995 |
| | | | US 6242667 B1 | 05-06-2001 |
| | | | US 2002152489 A1 | 17-10-2002 |
| | | | AU 3092395 A | 25-01-1996 |
| | | | AU 4456699 A | 25-11-1999 |
| | | | CA 2193122 A1 | 18-01-1996 |
| | | | CN 1167504 A | 10-12-1997 |
| | | | DE 804565 T1 | 04-05-2000 |
| | | | EP 1092771 A2 | 18-04-2001 |
| | | | EP 0804565 A1 | 05-11-1997 |
| | | | ES 2139552 T1 | 16-02-2000 |
| | | | FI 965287 A | 28-02-1997 |
| | | | JP 11506901 T | 22-06-1999 |
| | | | NO 965623 A | 28-02-1997 |
| | | | WO 9601313 A1 | 18-01-1996 |
| | | | US 6136954 A | 24-10-2000 |
| | | | US 2004003417 A1 | 01-01-2004 |
| | | | US 6004941 A | 21-12-1999 |
| | | | US 5589362 A | 31-12-1996 |
| | | | US 5814618 A | 29-09-1998 |
| | | | US 5866755 A | 02-02-1999 |
| | | | US 6271348 B1 | 07-08-2001 |
| | | | US 2003022315 A1 | 30-01-2003 |
| | | | US 6252136 B1 | 26-06-2001 |
| | | | US 2002077307 A1 | 20-06-2002 |
| | | | US 5888981 A | 30-03-1999 |
| | | | US 5859310 A | 12-01-1999 |
| | | | US 2002086426 A1 | 04-07-2002 |
| | | | US 2002152487 A1 | 17-10-2002 |
| | | | US 5922927 A | 13-07-1999 |
| | | | AU 684524 B2 | 18-12-1997 |
| | | | AU 7108194 A | 03-01-1995 |
| | | | CA 2165162 A1 | 22-12-1994 |
| | | | DE 705334 T1 | 30-12-1999 |
| | | | EP 0705334 A1 | 10-04-1996 |
| | | | ES 2140359 T1 | 01-03-2000 |
| | | | JP 9500526 T | 21-01-1997 |
| | | | WO 9429442 A2 | 22-12-1994 |
| US 5733727 | A | 31-03-1998 | US 5602301 A | 11-02-1997 |
| | | | US 6399300 B1 | 04-06-2002 |
| | | | US RE37978 E1 | 04-02-2003 |
| | | | US 2001038837 A1 | 08-11-2001 |
| | | | US 2002061295 A1 | 23-05-2002 |
| | | | US 6015671 A | 18-01-2000 |
| | | | AU 688427 B2 | 12-03-1998 |
| | | | AU 1097695 A | 06-06-1995 |
| | | | AU 697666 B2 | 15-10-1998 |
| | | | AU 5214198 A | 19-03-1998 |
| | | | CA 2174860 A1 | 26-05-1995 |
| | | | EP 0729506 A1 | 04-09-1996 |
| | | | JP 9505471 T | 03-06-1997 |
| | | | WO 9514079 A1 | 26-05-1995 |
| WO 0187330 | A | 22-11-2001 | AU 6158501 A | 26-11-2001 |

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 24 JAN 2005

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

| | | |
|--|---|--|
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts R62628PC | WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/PEA/416) | |
| Internationales Aktenzeichen PCT/CH 03/00665 | Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 13.10.2003 | Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 14.10.2002 |
| Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/12 | | |
| Anmelder F. HOFFMANN-LA ROCHE AG et al. | | |

1. Dieser Internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.



2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Bescheids
- II ☐ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Regel 66.2 a)ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

| | |
|--|--|
| Datum der Einreichung des Antrags 06.04.2004 | Datum der Fertigstellung dieses Berichts 24.01.2005 |
| Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde  Europäisches Patentamt - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016 | Bevollmächtigter Bediensteter Madruga, J Tel. +31 70 340-3121  |

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):

Beschreibung, Seiten

1-64 in der ursprünglich eingereichten Fassung

Ansprüche, Nr.

1-34 in der ursprünglich eingereichten Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um:

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☒ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☒ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen.)

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

☐ die gesamte internationale Anmeldung,

☒ Ansprüche Nr. 20,21,28-30, 33, 34

Begründung:

☒ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 20,21,28-30, 33, 34 (gewerbliche Anwendung) beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):

siehe Beiblatt

☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie bitte nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):

☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.

☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:

☐ Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

☐ Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung
Neuheit (N)

Ja: Ansprüche 9,10

Nein: Ansprüche 1-8, 11-34

Erfinderische Tätigkeit (IS)

Ja: Ansprüche

Nein: Ansprüche 1-34

Gewerbliche Anwendbarkeit (IA)

Ja: Ansprüche: 1-19, 22-27, 31, 32

Nein: Ansprüche:

2. Unterlagen und Erklärungen:

siehe Beiblatt

III. Keine Erstellung eines Gutachten

1. Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände der vorliegenden Ansprüche 20,21,28-30, 33, 34 **gewerblich anwendbar** sind, gibt es in den PCT-Vertragsstaaten keine einheitlichen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.

V. Begründete Feststellung (Fortsetzung)

2 STAND DER TECHNIK (Regel 64.1 - 64.3 PCT)

- D1: US-A-5 912 411 (BUJARD HERMANN ET AL) 15. Juni 1999 (1999-06-15)
- D2: US-A-5 733 727 (FIELD LOREN J) 31. März 1998 (1998-03-31)
- D3: KOH GOU YOUNG ET AL: 'Targeted expression of transforming growth factor-beta-1 in intracardiac grafts promotes vascular endothelial cell DNA synthesis' JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, Bd. 95, Nr. 1, 1995, Seiten 114-121, XP008031081 ISSN: 0021-9738
- D4: WO 01/87330 A (LACRAZ SYLVIE FERRARI;KIM YON SU; ZHENG XIN XIAO; MASLINSKI WLODZIMIER) 22. November 2001 (2001-11-22) in der Anmeldung erwähnt
- D5: FERRARI-LACRAZ S ET AL: 'An antagonist IL-15/Fc protein prevents costimulation blockade-resistant rejection' JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, Bd. 167, Nr. 6, 15. September 2001 (2001-09-15), Seiten 3478-3485, XP002185137 ISSN: 0022-1767 in der Anmeldung erwähnt
- D6: WO 01/71006 A (FRANZ WOLFGANG M) 27. September 2001 (2001-09-27)

3 NEUHEIT (Artikel 33(2) PCT)

- 3.1 D1 offenbart tierische nicht-totipotente Zellen (z.B. Haematopoietische Stammzellen), die eine Nukleinsäure enthalten, welche für einen Immunmodulator (z. B. TNF, IL-2, gamma-IFN, IL-1, IL-12, IL-10, IL-4, MHC class I and II, B7-1, B7-2, CD40, CTLA4Ig Fusionsprotein) unter der Kontrolle eines durch Zugabe einer Wirksubstanz regulierbaren Genschaltermoleküls (Tetracyclin-regulierbares Genschalterssystem) kodiert sowie ihre Verwendung zur Transplantation, zur Inhibierung einer Transplantationsabstoßungsreaktion sowie transgene Säugetiere, die solche Nukleinsäuren enthalten (siehe D1, Spalten 37-42, Ansprüche). Daher ist der Gegenstand der Ansprüche **1-8, 11-34** nicht neu.
- 3.2 D2 und D3 offenbaren eine nicht-totipotente Zelllinie (C2C12 Myoblasten), die eine Nukleinsäure enthält, welche für einen Immunmodulator (TGF-beta1) unter der Kontrolle eines durch Zugabe einer Wirksubstanz regulierbaren Genschaltermoleküls (Metallothionein Promotors) kodiert. Daher ist der Gegenstand der Ansprüche **1,2,4,6,8,11-13,15-24** nicht neu.
- 3.3 Die vorliegende Anmeldung erfüllt nicht die Erfordernisse des Artikels 33(1) PCT, weil der Gegenstand der Ansprüche **1-8, 11-34** im Sinne von Artikel 33(2) PCT nicht neu ist.

4 ERFINDERISCHE TÄTIGKEIT (Artikel 33(3) PCT)

- 4.1 Dokument D1 ist der nächstliegende Stand der Technik (siehe oben). Die mit der vorliegenden Erfindung zu lösende **Aufgabe** kann somit in der Bereitstellung einer Zelle, die zur Inhibierung einer Transplantations-abstoßungsreaktion verwendet werden kann, gesehen werden. Die **Lösung** ist die Verwendung von Zellen, die einen Nukleinsäuren enthalten, die für ein Fusionsprotein aus einem mutierten IL-15 und einen Fc-Fragment unter der Kontrolle eines durch Zugabe einer Wirksubstanz regulierbaren Genexpressionssystems kodieren.
- 4.2 Die in Anspruch 9 der vorliegenden Anmeldung vorgeschlagene Lösung kann aus folgenden Gründen nicht als erfinderisch betrachtet werden (Artikel 33(3) PCT):
- 4.2.1 In Dokument D4 wird beschrieben, dass ein **Fusionsprotein aus einem mutierten IL-15 und einen Fc-Fragment** (mutIL-15/Fc) die Immunantwort

inhibiert. D4 offenbart die Transfektion solcher Fusionsproteine in eine Zelle und deren Verwendung zur Transplantation. Die Zelle mit mutIL-15/Fc Fusionsprotein bietet dieselben Vorteile wie die in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen. Für den Fachmann wäre es daher naheliegend, dieses Merkmal (mutIL-15/Fc) in das in D1 beschriebene System aufzunehmen, um die gestellte Aufgabe zu lösen.

- 4.3 Die abhängigen Ansprüche scheinen keine zusätzlichen Merkmale zu enthalten, die in Kombination mit den Merkmalen irgendeines Anspruchs, auf den die Ansprüche rückbezogen sind, zu einem auf erfinderischer Tätigkeit beruhenden Gegenstand führen könnten.
- 4.4 Die vorliegende Anmeldung erfüllt das in Artikel 33(3) PCT genannte Kriterium nicht, weil der Gegenstand der Ansprüche 1-34 nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit beruht (Regel 65.1, 65.2 PCT).

3 KLARHEIT, STÜTZUNG UND OFFENBARUNG (Art. 6 und 5 PCT)

- 3.1 Der in dem Anspruch 9 benutzte Begriff "**mutierten IL-15**" ist unbestimmt und macht den Gegenstand des Anspruchs unklar (Artikel 6 PCT).
- 3.2 Die Ansprüche 1-6, 11-13, sowie die davon indirektabhängigen Ansprüche 17-34 entsprechen nicht den Erfordernissen des Artikels 6 PCT, weil der Gegenstand des Schutzbegehrens nicht klar definiert ist. In den Ansprüchen wird versucht, den Gegenstand durch das zu erreichende Ergebnis zu definieren; damit wird aber lediglich die zu lösende Aufgabe angegeben. Da die unabhängige Anspruche notwendige technische Merkmale nicht enthalten, entsprechen sie nicht dem Erfordernis des Artikels 6 PCT in Verbindung mit Regel 6.3 b) PCT, daß jeder unabhängige Anspruch alle technischen Merkmale enthalten muß, die für die Definition der Erfindung wesentlich sind.

Translation

ENT COOPERATION TREATY

PCT/CH2003/000665



PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

| | | |
|---|---|--|
| Applicant's or agent's file reference R62628PC | FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) | |
| International application No. PCT/CH2003/000665 | International filing date (day/month/year) 13 October 2003 (13.10.2003) | Priority date (day/month/year) 14 October 2002 (14.10.2002) |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/12, | | |
| Applicant F. HOFFMANN-LA ROCHE AG et al. | | |

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

| | |
|--|---|
| Date of submission of the demand 06 April 2004 (06.04.2004) | Date of completion of this report 24 January 2005 (24.01.2005) |
| Name and mailing address of the IPEA/EP | Authorized officer |
| Facsimile No. | Telephone No. |

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/CH2003/000665

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☒ the description:
 pages _____ 1-64 _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
 pages _____ 1-34 _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☒ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☒ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☒ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International Application No.

PCT/CH2003/000665

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 20, 21, 28-30, 33, 34

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 20, 21, 28-30, 33, 34 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

- ☐ no international search report has been established for said claims Nos. _____.

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

- ☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.
- ☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: Box III.1.

Non-establishment of opinion

The PCT Contracting States do not have uniform criteria for assessing the **industrial applicability** of claims 20, 21, 28 to 30, 33 and 34 in their present form. Patentability may also depend on the wording of the claims. The EPO, for example, does not recognise the industrial applicability of claims to the medical use of a compound; it may, however, allow claims to the first medical application of a known compound or to the use of such a compound in the manufacture of a drug for a new medical application.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International Application No.

PCT/CH 03/00665

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

| | | | |
|-------------------------------|--------|---------------------|-----|
| Novelty (N) | Claims | 9, 10 | YES |
| | Claims | 1-8, 11-34 | NO |
| Inventive step (IS) | Claims | | YES |
| | Claims | 1-34 | NO |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-19, 22-27, 31, 32 | YES |
| | Claims | | NO |

2. Citations and explanations**1 PRIOR ART (PCT Rule 64.1 - 64.3)**

D1: US-A-5 912 411 (BUJARD HERMANN ET AL) 15 June 1999 (1999-06-15)

D2: US-A-5 733 727 (FIELD LOREN J) 31 March 1998 (1998-03-31)

D3: KOH GOU YOUNG ET AL: 'Targeted expression of transforming growth factor-beta-1 in intracardiac grafts promotes vascular endothelial cell DNA synthesis' JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, Vol. 95, No. 1, 1995, pages 114-121, XP008031081 ISSN: 0021-9738

D4: WO 01/87330 A (LACRAZ SYLVIE FERRARI; KIM YON SU; ZHENG XIN XIAO; MASLINSKI WLODZIMIER) 22 November 2001 (2001-11-22) cited in the application

D5: FERRARI-LACRAZ S ET AL: 'An antagonist IL-15/Fc protein prevents costimulation blockade-resistant rejection' JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, Vol. 167, No. 6, 15 September 2001 (2001-09-15), pages 3478-3485, XP002185137 ISSN: 0022-1767 cited in the application

D6: WO 01/71006 A (FRANZ WOLFGANG M) 27 September

2001 (2001-09-27)

2 NOVELTY (PCT Article 33(2))

- 2.1 D1 discloses animal non-totipotent cells (e.g. haematopoietic stem cells) that contain a nucleic acid that codes for an immunomodulator (e.g. TNF, IL-2, gamma-IFN, IL-1, IL-12, IL-10, IL-4, MHC class I and II, B7-1, B7-2, CD40, CTLA4lg fusion protein) with the control of a gene switch molecule which can be regulated by adding an active substance (tetracycline-regulable gene switch system), and the use thereof in transplants, for inhibiting transplant rejection, and transgenic mammals that contain this type of nucleic acid (see D1, columns 37 to 42, and the claims). The subject matter of claims 1 to 8 and 11 to 34 thus lacks novelty.
- 2.2 D2 and D3 each disclose a non-totipotent cell line (C2C12 myoblasts) that contains a nucleic acid which codes for an immunomodulator (TGF-beta 1) with the control of a gene switch molecule (metallothionein promoters) that can be regulated by adding an active substance. The subject matter of claims 1, 2, 4, 6, 8, 11 to 13 and 15 to 24 thus lacks novelty.
- 2.3 The present application does not meet the requirements of PCT Article 33(1) because the subject matter of claims 1 to 8 and 11 to 34 lacks novelty (PCT Article 33(2)).

3 INVENTIVE STEP (PCT Article 33(3))

3.1 Document D1 is the closest prior art (see above). The present invention can therefore be considered to address the **problem** of developing a cell that can be used to inhibit transplant rejections. The **solution** involves using cells that contain a nucleic acid that codes for a fusion protein from a mutated IL-15 and an Fc fragment with the control of a gene expression system that can be regulated by adding an active substance.

3.2 The solution proposed in claim 9 of the present application cannot be considered inventive for the following reasons (PCT Article 33(3)):

3.2.1 Document D4 indicates that a **fusion protein from a mutated IL-15 and an Fc fragment** (mutIL-15/Fc) inhibits the immune response. D4 discloses the transfection of this type of fusion protein into a cell and the use thereof in transplants. The cell with the mutIL-15/Fc fusion protein offers the same advantages as those described by the present application. It would therefore have been obvious to a person skilled in the art to include this feature (mutIL-15/Fc) in the system described in D1 in order to solve the problem of interest.

3.3 The dependent claims do not appear to contain any additional features which, in combination with the features of any claim to which they refer back, could yield subject matter involving an inventive step.

3.4 The present application does not satisfy the criterion in PCT Article 33(3) because the subject matter of claims 1 to 34 does not involve an inventive step (PCT Rule 65.1 and 65.2).

4 **CLARITY, SUPPORT AND DISCLOSURE** (PCT Articles 5 and 6)

4.1 The term "mutated IL-15" in claim 9 is not defined and thus renders the subject matter of the claim unclear (PCT Article 6).

4.2 Claims 1 to 6 and 11 to 13, and claims 17 to 34, which are indirectly dependent thereon, do not meet the requirements of PCT Article 6 because the subject matter for which protection is sought is not clearly defined. The claims attempt to define the subject matter in terms of the result to be achieved, but in so doing merely state the problem to be solved. Since the independent claims do not contain necessary technical features, they do not meet the requirement of PCT Article 6 in conjunction with PCT Rule 6.3(b) that each independent claim must include all the technical features essential to the definition of the invention.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

| | | |
|--|---|---|
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts Case 21908 | WEITERES VORGEHEN | siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5 |
| Internationales Aktenzeichen PCT/CH 03/00665 | Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 13/10/2003 | (Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 14/10/2002 |
| Anmelder F. HOFFMANN-LA ROCHE AG | | |

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 7 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☒ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☒ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☒ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☐ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☒ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

TRANSPLANTIERBARE ZELLE MIT IMMUNMODULATOR

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ keine der Abb.

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/12 C12N15/62 C12N15/63 C12N5/06 C12N5/08
 C12N5/10 A01K67/027 A61K35/34 A61K35/39 C07K14/705
 C07K14/54 C07K16/46 C07K16/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|-------------------------------|
| X | ✓ US 5 912 411 A (BUJARD HERMANN ET AL) 15. Juni 1999 (1999-06-15) | 1-8, 11-34 |
| Y | Spalte 37 -Spalte 42 --- | 9,10 |
| X | ✓ US 5 733 727 A (FIELD LOREN J) 31. März 1998 (1998-03-31) | 1,2,4,6, 8,11-13, 15-24 |
| X | Beispiel 5 --- | 3,5 |
| X | ✓ KOH GOU YOUNG ET AL: "Targeted expression of transforming growth factor-beta-1 in intracardiac grafts promotes vascular endothelial cell DNA synthesis" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, Bd. 95, Nr. 1, 1995, Seiten 114-121, XP008031081 ISSN: 0021-9738 | 1,2,4,6, 8,11-13, 15-24 |
| X | das ganze Dokument --- | 5 |
| | -/-- | |



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. Mai 2004

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

22/06/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Madruga, J

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| Y | <p>✓ WO 01/87330 A (LACRAZ SYLVIE FERRARI;KIM YON SU; ZHENG XIN XIAO; MASLINSKI WLODZIMIER) 22. November 2001 (2001-11-22) in der Anmeldung erwähnt Seite 1; Ansprüche Seite 3, Zeile 13 -Seite 11, Zeile 10 Seite 13, Zeile 1 -Seite 18, Zeile 6 Seite 30, Zeile 10 -Seite 32, Zeile 18 ---</p> | 9,10 |
| A | <p>✓ FERRARI-LACRAZ S ET AL: "An antagonist IL-15/Fc protein prevents costimulation blockade-resistant rejection" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, Bd. 167, Nr. 6, 15. September 2001 (2001-09-15), Seiten 3478-3485, XP002185137 ISSN: 0022-1767 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---</p> | 9,10 |
| A | <p>✓ WO 01/71006 A (FRANZ WOLFGANG M) 27. September 2001 (2001-09-27) Seite 5; Ansprüche; Abbildung 1 ---</p> | |
| A | <p>✓ WO 01/40494 A (COUTURE CLEMENT ;JAALOUK DIANA E (CA); MADER SYLVIE (CA); CT FOR T) 7. Juni 2001 (2001-06-07) Ansprüche ---</p> | |
| A | <p>✓ WO 00/12741 A (MEHTALI MAJID ;SORG GUSS TANIA (FR); TRANSGENE SA (FR)) 9. März 2000 (2000-03-09) Beispiel 10 ---</p> | |
| A | <p>✓ STROM T B ET AL: "Allogeneic stem cells, clinical transplantation, and the origins of regenerative medicine." TRANSPLANTATION PROCEEDINGS. UNITED STATES 2001 NOV-DEC, Bd. 33, Nr. 7-8, November 2001 (2001-11), Seiten 3044-3049, XP002282652 ISSN: 0041-1345 das ganze Dokument -----</p> | |

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Die geltenden Patentansprüche 1-34 beziehen sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Verbindungen, Produkte, Vorrichtungen oder Verfahren, nämlich im Bezug auf "Immunmodulator". In der Tat umfassen sie so viele Wahlmöglichkeiten, Veränderliche, mögliche Permutationen und/oder Einschränkungen, daß sie im Sinne von Art. 6 PCT in einem solchen Maße unklar (und/oder zu weitläufig gefasst) erscheinen, als daß sie eine sinnvolle Recherche ermöglichen. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, die als klar und knapp gefaßt gelten können, nämlich die Immunmodulatoren wie diese in den Ausführungsbeispielen, wie in der Beschreibung auf Seite 9-10 und wie in die Ansprüche angegeben sind.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. —
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Obwohl die Ansprüche 20,21,28,29,30,33,34 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☒ Ansprüche Nr. —
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr. —
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. —
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt: —

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Abkommen
PCT/CH 03/0665

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|---|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| US 5912411 | A | 15-06-1999 | US 5789156 A | 04-08-1998 |
| | | | US 5654168 A | 05-08-1997 |
| | | | US 5650298 A | 22-07-1997 |
| | | | US 5464758 A | 07-11-1995 |
| | | | US 6242667 B1 | 05-06-2001 |
| | | | US 2002152489 A1 | 17-10-2002 |
| | | | AU 3092395 A | 25-01-1996 |
| | | | AU 4456699 A | 25-11-1999 |
| | | | CA 2193122 A1 | 18-01-1996 |
| | | | CN 1167504 A | 10-12-1997 |
| | | | DE 804565 T1 | 04-05-2000 |
| | | | EP 1092771 A2 | 18-04-2001 |
| | | | EP 0804565 A1 | 05-11-1997 |
| | | | ES 2139552 T1 | 16-02-2000 |
| | | | FI 965287 A | 28-02-1997 |
| | | | JP 11506901 T | 22-06-1999 |
| | | | NO 965623 A | 28-02-1997 |
| | | | WO 9601313 A1 | 18-01-1996 |
| | | | US 6136954 A | 24-10-2000 |
| | | | US 2004003417 A1 | 01-01-2004 |
| | | | US 6004941 A | 21-12-1999 |
| | | | US 5589362 A | 31-12-1996 |
| | | | US 5814618 A | 29-09-1998 |
| | | | US 5866755 A | 02-02-1999 |
| | | | US 6271348 B1 | 07-08-2001 |
| | | | US 2003022315 A1 | 30-01-2003 |
| | | | US 6252136 B1 | 26-06-2001 |
| | | | US 2002077307 A1 | 20-06-2002 |
| | | | US 5888981 A | 30-03-1999 |
| | | | US 5859310 A | 12-01-1999 |
| | | | US 2002086426 A1 | 04-07-2002 |
| | | | US 2002152487 A1 | 17-10-2002 |
| | | | US 5922927 A | 13-07-1999 |
| | | | AU 684524 B2 | 18-12-1997 |
| | | | AU 7108194 A | 03-01-1995 |
| | | | CA 2165162 A1 | 22-12-1994 |
| | | | DE 705334 T1 | 30-12-1999 |
| | | | EP 0705334 A1 | 10-04-1996 |
| | | | ES 2140359 T1 | 01-03-2000 |
| | | | JP 9500526 T | 21-01-1997 |
| | | | WO 9429442 A2 | 22-12-1994 |
| US 5733727 | A | 31-03-1998 | US 5602301 A | 11-02-1997 |
| | | | US 6399300 B1 | 04-06-2002 |
| | | | US RE37978 E1 | 04-02-2003 |
| | | | US 2001038837 A1 | 08-11-2001 |
| | | | US 2002061295 A1 | 23-05-2002 |
| | | | US 6015671 A | 18-01-2000 |
| | | | AU 688427 B2 | 12-03-1998 |
| | | | AU 1097695 A | 06-06-1995 |
| | | | AU 697666 B2 | 15-10-1998 |
| | | | AU 5214198 A | 19-03-1998 |
| | | | CA 2174860 A1 | 26-05-1995 |
| | | | EP 0729506 A1 | 04-09-1996 |
| | | | JP 9505471 T | 03-06-1997 |
| | | | WO 9514079 A1 | 26-05-1995 |
| WO 0187330 | A | 22-11-2001 | AU 6158501 A | 26-11-2001 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/CH 03/00665

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| WO 0187330 | A | CA 2408691 A1 | 22-11-2001 |
| | | CN 1441675 T | 10-09-2003 |
| | | EP 1284747 A2 | 26-02-2003 |
| | | JP 2003533488 T | 11-11-2003 |
| | | WO 0187330 A2 | 22-11-2001 |
| | | US 2002128436 A1 | 12-09-2002 |
| WO 0171006 | A 27-09-2001 | DE 10014690 A1 | 18-10-2001 |
| | | AU 5622201 A | 03-10-2001 |
| | | WO 0171006 A2 | 27-09-2001 |
| | | EP 1218526 A2 | 03-07-2002 |
| | | US 2003003533 A1 | 02-01-2003 |
| WO 0140494 | A 07-06-2001 | AU 1685201 A | 12-06-2001 |
| | | WO 0140494 A1 | 07-06-2001 |
| | | CA 2392941 A1 | 07-06-2001 |
| | | EP 1234047 A1 | 28-08-2002 |
| | | US 2003031650 A1 | 13-02-2003 |
| WO 0012741 | A 09-03-2000 | FR 2782732 A1 | 03-03-2000 |
| | | AU 5426299 A | 21-03-2000 |
| | | CA 2341775 A1 | 09-03-2000 |
| | | EP 1108051 A2 | 20-06-2001 |
| | | WO 0012741 A2 | 09-03-2000 |
| | | JP 2002523106 T | 30-07-2002 |

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESEN

Absender: DIE MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

PCT

An

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
Grenzacherstrasse 124
CH-4070 Basel
SUISSE

MITTEILUNG ÜBER DEN EINGANG DES
ANTRAGS BEI DER ZUSTÄNDIGEN MIT DER
INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN PRÜFUNG
BEAUFTRAGTEN BEHÖRDE

(Regeln 59.3 e) und 61.1 b) Satz 1 PCT sowie
Abschnitt 601 a) der Verwaltungsvorschriften)

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr)

26. 04. 2004

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

Case 21908

WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen

PCT/CH03/00665

Internationales Anmeldedatum
(Tag/Monat/Jahr)

13/10/2003

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)

14/10/2002

Anmelder

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG et al.

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde nachstehendes Datum als Eingangsdatum des Antrags auf internationale vorläufige Prüfung der internationalen Anmeldung betrachtet:

06/04/2004

2. Dieses Eingangsdatum entspricht:

- ☐ dem tatsächlichen Eingangsdatum des Antrags bei der Behörde (Regel 61.1 b)).
☒ dem tatsächlichen Datum, an dem der Antrag für die Behörde entgegengenommen worden ist (Regel 59.3 e)).
☐ dem Datum, an dem die Behörde auf die Aufforderung zur Behebung von Mängeln des Antrags (Formblatt PCT/IPEA/404) hin die erforderlichen Berichtigungen erhalten hat.

3. ☐ **ACHTUNG:** Das Eingangsdatum liegt **nach** dem Ablauf von 19 Monaten ab dem Prioritätsdatum. Folglich führt der Antrag in bezug auf einige Ämter nicht zu einer Verschiebung des Eintritts in die nationale Phase auf 30 (oder in manchen Ämtern mehr) Monate ab dem Prioritätsdatum (Artikel 39 (1)) und die für den Eintritt in die nationale Phase erforderlichen Handlungen sind daher innerhalb von 20 (oder in manchen Ämtern mehr) Monaten ab dem Prioritätsdatum vorzunehmen. In bezug auf einige andere Ämter **dagegen** kann die Frist von 30 (oder mehr) Monaten dennoch Anwendung finden. Siehe Anhang zu Formblatt PCT/IB/301. Genaue Angaben zu den jeweils geltenden Fristen in den einzelnen Ämtern enthält der *PCT-Leitfaden für Anmelder*, BAND II, Nationale Kapitel sowie die Website der WIPO.

☐ (falls zutreffend) Diese Mitteilung gilt als Bestätigung der am _____
per Telefon, Fax oder persönlich erteilten Auskunft.

4. Nur wenn Punkt 3 zutrifft, wurde dem Internationalen Büro ein Exemplar dieser Mitteilung übermittelt.

Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen
Prüfung beauftragten Behörde

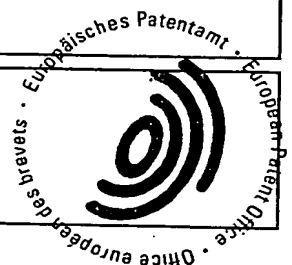


Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk - Niederlande
Tel.: (+31-70) 340-2040
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

WALLENTIN M C



Tel. (+31-70) 340-3991



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT (Artikel 36 und Regel 70 PCT)

| | | |
|---|--|--|
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts R62628PC | WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/PEA/416) | |
| Internationales Aktenzeichen PCT/CH 03/00665 | Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 13.10.2003 | Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 14.10.2002 |
| Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/12 | | |
| Anmelder F. HOFFMANN-LA ROCHE AG et al. | | |
| <p>1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p><input type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).</p> <p>Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.</p> | | |
| <p>3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <ul style="list-style-type: none">I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des BescheidsII <input type="checkbox"/> PrioritätIII <input checked="" type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche AnwendbarkeitIV <input type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der ErfindungV <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Regel 66.2 a)ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser FeststellungVI <input type="checkbox"/> Bestimmte angeführte UnterlagenVII <input type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen AnmeldungVIII <input type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung | | |
| Datum der Einreichung des Antrags 06.04.2004 | Datum der Fertigstellung dieses Berichts 24.01.2005 | |
| Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde  Europäisches Patentamt - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016 | Bevollmächtigter Bediensteter Madruga, J Tel. +31 70 340-3121  | |

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):

Beschreibung, Seiten

1-64 in der ursprünglich eingereichten Fassung

Ansprüche, Nr.

1-34 in der ursprünglich eingereichten Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um:

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☒ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☒ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen.)

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

☐ die gesamte internationale Anmeldung,

☒ Ansprüche Nr. 20,21,28-30, 33, 34

Begründung:

☒ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 20,21,28-30, 33, 34 (gewerbliche Anwendung) beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):

siehe Beiblatt

☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie bitte nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):

☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.

☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:

☐ Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

☐ Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)

Ja: Ansprüche 9,10

Nein: Ansprüche 1-8, 11-34

Erfinderische Tätigkeit (IS)

Ja: Ansprüche

Nein: Ansprüche 1-34

Gewerbliche Anwendbarkeit (IA)

Ja: Ansprüche: 1-19, 22-27, 31, 32

Nein: Ansprüche:

2. Unterlagen und Erklärungen:

siehe Beiblatt

III. Keine Erstellung eines Gutachten

1. Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände der vorliegenden Ansprüche 20,21,28-30, 33, 34 **gewerblich anwendbar** sind, gibt es in den PCT-Vertragsstaaten keine einheitlichen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.

V. Begründete Feststellung (Fortsetzung)

2 STAND DER TECHNIK (Regel 64.1 - 64.3 PCT)

- D1: US-A-5 912 411 (BUJARD HERMANN ET AL) 15. Juni 1999 (1999-06-15)
- D2: US-A-5 733 727 (FIELD LOREN J) 31. März 1998 (1998-03-31)
- D3: KOH GOU YOUNG ET AL: 'Targeted expression of transforming growth factor-beta-1 in intracardiac grafts promotes vascular endothelial cell DNA synthesis' JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, Bd. 95, Nr. 1, 1995, Seiten 114-121, XP008031081 ISSN: 0021-9738
- D4: WO 01/87330 A (LACRAZ SYLVIE FERRARI;KIM YON SU; ZHENG XIN XIAO; MASLINSKI WLODZIMIER) 22. November 2001 (2001-11-22) in der Anmeldung erwähnt
- D5: FERRARI-LACRAZ S ET AL: 'An antagonist IL-15/Fc protein prevents costimulation blockade-resistant rejection' JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, Bd. 167, Nr. 6, 15. September 2001 (2001-09-15), Seiten 3478-3485, XP002185137 ISSN: 0022-1767 in der Anmeldung erwähnt
- D6: WO 01/71006 A (FRANZ WOLFGANG M) 27. September 2001 (2001-09-27)

3 NEUHEIT (Artikel 33(2) PCT)

- 3.1 D1 offenbart tierische nicht-totipotente Zellen (z.B. Haematopoietische Stammzellen), die eine Nukleinsäure enthalten, welche für einen Immunmodulator (z. B. TNF, IL-2, gamma-IFN, IL-1, IL-12, IL-10, IL-4, MHC class I and II, B7-1, B7-2, CD40, CTLA4Ig Fusionsprotein) unter der Kontrolle eines durch Zugabe einer Wirksubstanz regulierbaren Genschaltermoleküls (Tetracyclin-regulierbares Genschalterssystem) kodiert sowie ihre Verwendung zur Transplantation, zur Inhibierung einer Transplantationsabstoßungsreaktion sowie transgene Säugetiere, die solche Nukleinsäuren enthalten (siehe D1, Spalten 37-42, Ansprüche). Daher ist der Gegenstand der Ansprüche **1-8, 11-34** nicht neu.
- 3.2 D2 und D3 offenbaren eine nicht-totipotente Zelllinie (C2C12 Myoblasten), die eine Nukleinsäure enthält, welche für einen Immunmodulator (TGF-beta1) unter der Kontrolle eines durch Zugabe einer Wirksubstanz regulierbaren Genschaltermoleküls (Metallothionein Promotors) kodiert. Daher ist der Gegenstand der Ansprüche **1,2,4,6,8,11-13,15-24** nicht neu.
- 3.3 Die vorliegende Anmeldung erfüllt nicht die Erfordernisse des Artikels 33(1) PCT, weil der Gegenstand der Ansprüche **1-8, 11-34** im Sinne von Artikel 33(2) PCT nicht neu ist.

4 ERFINDERISCHE TÄTIGKEIT (Artikel 33(3) PCT)

- 4.1 Dokument D1 ist der nächstliegende Stand der Technik (siehe oben). Die mit der vorliegenden Erfindung zu lösende **Aufgabe** kann somit in der Bereitstellung einer Zelle, die zur Inhibierung einer Transplantations-abstoßungsreaktion verwendet werden kann, gesehen werden. Die **Lösung** ist die Verwendung von Zellen, die einen Nukleinsäuren enthalten, die für ein Fusionsprotein aus einem mutierten IL-15 und einen Fc-Fragment unter der Kontrolle eines durch Zugabe einer Wirksubstanz regulierbaren Genexpressionssystems kodieren.
- 4.2 Die in Anspruch 9 der vorliegenden Anmeldung vorgeschlagene Lösung kann aus folgenden Gründen nicht als erfinderisch betrachtet werden (Artikel 33(3) PCT):
- 4.2.1 In Dokument D4 wird beschrieben, dass ein **Fusionsprotein aus einem mutierten IL-15 und einen Fc-Fragment** (mutIL-15/Fc) die Immunantwort

inhibiert. D4 offenbart die Transfektion solcher Fusionsproteine in eine Zelle und deren Verwendung zur Transplantation. Die Zelle mit mutIL-15/Fc Fusionsprotein bietet dieselben Vorteile wie die in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen. Für den Fachmann wäre es daher naheliegend, dieses Merkmal (mutIL-15/Fc) in das in D1 beschriebene System aufzunehmen, um die gestellte Aufgabe zu lösen.

- 4.3 Die abhängigen Ansprüche scheinen keine zusätzlichen Merkmale zu enthalten, die in Kombination mit den Merkmalen irgendeines Anspruchs, auf den die Ansprüche rückbezogen sind, zu einem auf erfinderischer Tätigkeit beruhenden Gegenstand führen könnten.
- 4.4 Die vorliegende Anmeldung erfüllt das in Artikel 33(3) PCT genannte Kriterium nicht, weil der Gegenstand der Ansprüche 1-34 nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit beruht (Regel 65.1, 65.2 PCT).

3 KLARHEIT, STÜTZUNG UND OFFENBARUNG (Art. 6 und 5 PCT)

- 3.1 Der in dem Anspruch 9 benutzte Begriff "**mutierten IL-15**" ist unbestimmt und macht den Gegenstand des Anspruchs unklar (Artikel 6 PCT).
- 3.2 Die Ansprüche 1-6, 11-13, sowie die davon indirektabhängigen Ansprüche 17-34 entsprechen nicht den Erfordernissen des Artikels 6 PCT, weil der Gegenstand des Schutzbegehrens nicht klar definiert ist. In den Ansprüchen wird versucht, den Gegenstand durch das zu erreichende Ergebnis zu definieren; damit wird aber lediglich die zu lösende Aufgabe angegeben. Da die unabhängige Ansprüche notwendige technische Merkmale nicht enthalten, entsprechen sie nicht dem Erfordernis des Artikels 6 PCT in Verbindung mit Regel 6.3 b) PCT, daß jeder unabhängige Anspruch alle technischen Merkmale enthalten muß, die für die Definition der Erfindung wesentlich sind.

PCT

ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszufüllen

Internationales Aktenzeichen

Internationales Anmeldedatum

Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)
(max. 12 Zeichen) Case 21908

Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG
Transplantierbare Zelle

Feld Nr. II ANMELDER

☐ Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

F. Hoffmann-La Roche AG
Grenzacherstrasse 124
CH-4070 Basel, Schweiz

Telefonnr.:

41+61 688 11 11

Telefaxnr.:

41+61 688 13 95

Fernschreibnr.:

Registrierungsnr. des Anmelders beim Amt:

Staatsangehörigkeit (Staat):

CH

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

CH

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐

alle Bestimmungsstaaten

☒

alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐

nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐

die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

BURCIN, Mark
Mommensenstrasse 18
D-40699 Erkrath, Germany

Diese Person ist:

☐

nur Anmelder

☒

Anmelder und Erfinder

☐

nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Registrierungsnr. des Anmelders beim Amt:

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐

alle Bestimmungsstaaten

☐

alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒

nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐

die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☒

Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ODER ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als:

☐

Anwalt

☒

gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

F. Hoffmann-La Roche AG
Grenzacherstrasse 124
CH-4070 Basel, Schweiz

Telefonnr.:

41+61 688 11 11

Telefaxnr.:

41+61 688 13 95

Fernschreibnr.:

Registrierungsnr. des Anwalts beim Amt:

☐

Zustellanschrift: Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.

Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Wird keines der folgenden Felder benutzt, so sollte dieses Blatt dem Antrag nicht beigelegt werden.

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

ESSER, Sybille
Sedentalerstrasse 20
D-40699 Erkrath, Germany

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
☒ Anmelder und Erfinder
☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Registrierungsnr. des Anmelders beim Amt:

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

- ☐ alle Bestimmungsstaaten ☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

RUEDIGER, Manfred
Kitzbuehler Weg 34
D-40789 Monheim, Germany

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
☒ Anmelder und Erfinder
☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Registrierungsnr. des Anmelders beim Amt:

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

- ☐ alle Bestimmungsstaaten ☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
☐ Anmelder und Erfinder
☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Registrierungsnr. des Anmelders beim Amt:

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

- ☐ alle Bestimmungsstaaten ☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
☐ Anmelder und Erfinder
☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Registrierungsnr. des Anmelders beim Amt:

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

- ☐ alle Bestimmungsstaaten ☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. IX KONTROLLISTE; EINREICHUNGSSPRACHE

Diese internationale Anmeldung enthält:

(a) auf Papier, die folgende Anzahl Blätter:

Antrag (inklusive Erklärungsblätter) : 5
 Beschreibung (ohne Sequenzprotokolle und/oder diesbezügliche Tabellen) : 64
 Ansprüche : 8
 Zusammenfassung :
 Zeichnungen :
 Teilanzahl : 77
 Sequenzprotokolle :
 diesbezügliche Tabellen :
(für beide, Anzahl der Blätter, soweit auf Papier eingereicht wird, unabhängig davon, ob zusätzlich auch in computerlesbarer Form eingereicht wird; siehe unter (c))
 Gesamtanzahl : 77

(b) ☐ ausschließlich in computerlesbarer Form (Abschnitt 801(a)(i))

- (i) ☐ Sequenzprotokolle
 (ii) ☐ diesbezügliche Tabellen

(c) ☐ auch in computerlesbarer Form (Abschnitt 801(a)(ii))

- (i) ☐ Sequenzprotokolle
 (ii) ☐ diesbezügliche Tabellen

Art und Anzahl der Datenträger (Diskette, CD-ROM, CD-R oder sonstige) auf denen sich befinden

- (i) ☐ Sequenzprotokolle:
 (ii) ☐ diesbezügliche Tabellen:
(zusätzliche eingereichte Kopien unter Punkt 9(ii) und/oder 10(ii) in der rechten Spalte angeben)

Dieser internationalen Anmeldung liegen die folgenden Unterlagen bei (kreuzen Sie die entsprechenden Kästchen an und geben Sie in der rechten Spalte jeweils die Anzahl der beiliegenden Exemplare an)

1. ☒ Blatt für die Gebührenberechnung : 1
 2. ☐ Original einer gesonderten Vollmacht :
 3. ☐ Original einer allgemeinen Vollmacht :
 4. ☐ Kopie der allgemeinen Vollmacht; Aktenzeichen (falls vorhanden):
 5. ☐ Begründung für das Fehlen einer Unterschrift :
 6. ☐ Prioritätsbeleg(e), in Feld Nr. VI durch folgende Zeilennummer(n) gekennzeichnet:
 7. ☐ Übersetzung der internationalen Anmeldung in die folgende Sprache:
 8. ☐ Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen oder anderem biologischen Material :
 9. ☐ Sequenzprotokolle in computerlesbarer Form (Art und Anzahl der Datenträger)
 (i) ☐ Kopie ausschließlich für die Zwecke der internationalen Recherche nach Regel 13ter (und nicht als Teil der internationalen Anmeldung) :
 (ii) ☐ (nur falls Felder (b)(i) oder (c)(i) in der linken Spalte angekreuzt wurden) zusätzliche Kopien einschließlich, soweit zutreffend, einer Kopie für die Zwecke der internationalen Recherche nach Regel 13ter :
 (iii) ☐ zusammen mit entsprechender Erklärung, daß die Kopie(n) mit dem in der linken Spalte aufgeführten Sequenzprotokollen identisch ist (sind) :
 10. ☐ Tabellen in computerlesbarer Form im Zusammenhang mit Sequenzprotokollen (Art und Anzahl der Datenträger)
 (i) ☐ Kopie ausschließlich für die Zwecke der internationalen Recherche nach Abschnitt 802(b-quater) (und nicht als Teil der internationalen Anmeldung) :
 (ii) ☐ (nur falls Felder (b)(ii) oder (c)(ii) in der linken Spalte angekreuzt wurden) zusätzliche Kopien einschließlich, soweit zutreffend, einer Kopie für die Zwecke der internationalen Recherche nach Abschnitt 802(b-quater) :
 (iii) ☐ zusammen mit entsprechender Erklärung, daß die Kopie(n) mit dem in der linken Spalte aufgeführten Tabellen identisch ist (sind) :
 11. ☐ Sonstige (einzeln auführen): :

Abbildung der Zeichnungen, die mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden soll (Nr.):

Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht wird:

Deutsch

Feld Nr. X UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS, DES ANWALTS ODER DES GEMEINSAMEN VERTRETERS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

F. Hoffmann-La Roche AG

Mark Burcin

Sybille Esser

Manfred Ruediger

Rüdiger Klausner
ProkuristDenise Strebel
Handlungsbevollmächtigte

Vom Anmeldeamt auszufüllen

1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:

3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:

4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:

5. Internationale Recherchenbehörde (falls zwei oder mehr zuständig sind): ISA /

6. ☐ Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben

2. Zeichnungen:

☐ eingegangen:☐ nicht eingegangen:

Vom Internationalen Büro auszufüllen

Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
Grenzacherstrasse 124
CH-4070 Basel
Switzerland

| | |
|--|---|
| Date of mailing (day/month/year) 29 October 2003 (29.10.03) | IMPORTANT NOTIFICATION |
| Applicant's or agent's file reference Case 21908 | International application No. PCT/CH03/00665 |

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (for all designated States except US)
BURCIN, Mark et al (for US)

International filing date : 13 October 2003 (13.10.03)
Priority date(s) claimed : 14 October 2002 (14.10.02)
Date of receipt of the record copy
by the International Bureau : 21 October 2003 (21.10.03)
List of designated Offices :

AP : GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW
EA : AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM
EP : AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR
OA : BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG
National : AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,
EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,
LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,
TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

ATTENTION

- The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase - see updated important information (as of April 2002)
☐ confirmation of precautionary designations (if applicable)
☒ requirements regarding priority documents (if applicable)

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

| | |
|--|--|
| The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 338.89.95 | Authorized officer: Catherine TOLU (Fax 338-8995) Telephone No. (41-22) 338 9958 |
|--|--|

INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated on the cover sheet of this Notification by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by Articles 22 and 39 and the applicable national laws. In addition, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. It is the applicant's responsibility to ensure the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

The applicable time limit for entering the national phase will, subject to what is said in the following paragraph, be **30 MONTHS** from the priority date, not only in respect of any elected Office where a demand for international preliminary examination is filed before the expiration of 19 months from the priority date (see Article 39(1)), but also in respect of any designated Office, in the absence of filing of such demand, where Article 22(1) as modified with effect from 1 April 2002 applies in respect of that designated Office. For further details, see PCT Gazette No. 44/2001 of 1 November 2001, pages 19926, 19932 and 19934, as well as the PCT Newsletter, October and November 2001 and February 2002 issues.

In practice, time limits other than the 30-month time limit will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain designated or elected Offices. For regular updates on the applicable time limits (20, 21, 30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the PCT Gazette ("Section IV" part published on a weekly basis), to the PCT Newsletter (on a monthly basis) and to the relevant National Chapters in Volume II of the PCT Applicant's Guide (the paper version of which is updated usually twice a year and the Internet version of which is updated usually on a weekly basis). Finally, a cumulative table of all applicable time limits for entering the national phase is available from WIPO's Internet site, via links from various pages the site including those of the Gazette, Newsletter and Guide, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in the PCT Applicant's Guide, Volume I/A, Chapter IX. Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II).

CONFIRMATION OF PRECAUTIONARY DESIGNATIONS

This notification lists only specific designations made under Rule 4.9(a) in the request. It is important to check that these designations are correct. Errors in designations can be corrected where precautionary designations have been made under Rule 4.9(b). The applicant is hereby reminded that any precautionary designations may be confirmed according to Rule 4.9(c) before the expiration of 15 months from the priority date (this time limit may not be extended). If it is not confirmed, it will automatically be regarded as withdrawn by the applicant. There will be no reminder and no invitation. Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying the designated State concerned (with indication of the kind of protection or treatment desired) and the payment of the designation and confirmation fees. The Notice of confirmation and payment must reach the receiving Office within the 15-month time limit.

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within the time limit which is reasonable under the circumstances.

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit is the filing date of the earliest application whose priority is claimed.

PCT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
Grenzacherstrasse 124
CH-4070 Basel
Switzerland

| | |
|--|--|
| Date of mailing (day/month/year) 12 February 2004 (12.02.2004) | IMPORTANT NOTIFICATION |
| Applicant's or agent's file reference Case 21908 | |
| International application No. PCT/CH2003/000665 | International filing date (day/month/year) 13 October 2003 (13.10.2003) |
| International publication date (day/month/year) Not yet published | Priority date (day/month/year) 14 October 2002 (14.10.2002) |
| Applicant F. HOFFMANN-LA ROCHE AG et al | |

- By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a **priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau** under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- (If applicable) An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a **priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b)** (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

| <u>Priority date</u> | <u>Priority application No.</u> | <u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u> | <u>Date of receipt of priority document</u> |
|---------------------------|---------------------------------|---|---|
| 14 Octo 2002 (14.10.2002) | 02022868.0 | EP | 09 Febr 2004 (09.02.2004) |

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 338.89.95

Authorized officer

A. LEDO PONTES

Telephone No. (41-22) 338 7046

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

ISENBRUCK BÖSL HÖRSCHLER WICHMANN
HUHN
Bösl, Raphael
Prinzregentenstr. 68
81675 München
Germany

B1 BÖ

FLB

B3 ATE

Sokr Str. sm.

EDV

Abg. X

Date of mailing (day/month/year)
25 October 2004 (25.10.2004)Applicant's or agent's file reference
R62628PCInternational application No.
PCT/CH2003/000665

IMPORTANT NOTIFICATION

International filing date (day/month/year)
13 October 2003 (13.10.2003)

1. The following indications appeared on record concerning:

☐ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☒ the common representative

Name and Address

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
Grenzacherstrasse 124
CH-4070 Basel
SwitzerlandIsenbruck | Bösl | Hörschler |
Wichmann | Huhn, Patentanwälte
Postfach 860880
D-81635 München

- 8. Nov. 2004

Frist:
Vorfrist:
WV:

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

0041 61 688 1111

Facsimile No.

0041 61 688 13 95

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

ISENBRUCK BÖSL HÖRSCHLER WICHMANN
HUHN
Bösl, Raphael
Prinzregentenstr. 68
81675 München
Germany

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

0049 89 99 88 54-0

Facsimile No.

0049 89 99 88 54-99

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

A new agent has been appointed, as indicated in Box 2. Please also note the changed file reference number as mentioned above.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority ☒ the elected Offices concerned
☒ the International Preliminary Examining Authority ☒ other: F. HOFFMANN-LA ROCHE AGThe International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 338.89.95

Authorized officer

Erich LORIS (Fax 338-8995)

Telephone No. (41-22) 338 9968

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
Grenzacherstrasse 124
CH-4070 Basel
SUISSEDate of mailing (day/month/year)
29 April 2004 (29.04.2004)Applicant's or agent's file reference
Case 21908**IMPORTANT NOTICE**International application No.
PCT/CH2003/000665International filing date (day/month/year)
13 October 2003 (13.10.2003)Priority date (day/month/year)
14 October 2002 (14.10.2002)

Applicant

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG et al

1. Notice is hereby given that the International Bureau has **communicated**, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this notice:

AU, AZ, BY, CH, CN, CO, DZ, EP, HU, JP, KG, KP, KR, MD, MK, MZ, RU, TM, US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

AE, AG, AL, AM, AP, AT, BA, BB, BG, BR, BZ, CA, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EA, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, ID, IL, IN, IS, KE, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MG, MN, MW, MX, NI, NO, NZ, OA, OM, PG, PH, PL, PT, RO, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 29 April 2004 (29.04.2004) under No. WO 2004/035787

4. **TIME LIMITS** for filing a demand for international preliminary examination and for entry into the national phase

The applicable time limit for entering the national phase will, **subject to what is said in the following paragraph**, be **30 MONTHS** from the priority date, not only in respect of any elected Office if a demand for international preliminary examination is filed before the expiration of **19 months** from the priority date, but also in respect of any designated Office, in the absence of filing of such demand, where Article 22(1) as modified with effect from 1 April 2002 applies in respect of that designated Office. For further details, see *PCT Gazette* No. 44/2001 of 1 November 2001, pages 19926, 19932 and 19934, as well as the *PCT Newsletter*, October and November 2001 and February 2002 issues.

In practice, **time limits other than the 30-month time limit** will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain designated or elected Offices. For **regular updates on the applicable time limits** (20, 21, 30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

For filing a demand for international preliminary examination, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Chapter IX. Only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II).

It is the applicant's sole responsibility to monitor all these time limits.

Publ.
DATENERFASSUNG

Erl: 6.5.04 he

6.5.04 he

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Athina Nickitas-Etienne

Facsimile No.+41 22 740 14 35

Facsimile No.+41 22 338 89 95

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
29. April 2004 (29.04.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/035787 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/12,
15/62, 15/63, 5/06, 5/08, 5/10, A01K 67/027, A61K 35/34,
35/39, C07K 14/705, 14/54, 16/46, 16/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/CH2003/000665

(22) Internationales Anmeldedatum:
13. Oktober 2003 (13.10.2003)

(25) Elnreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
02022868.0 14. Oktober 2002 (14.10.2002) EP

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): F. HOFFMANN-LA ROCHE AG [CH/CH]; Gren-
zacherstrasse 124, CH-4070 Basel (CH).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BURCIN, Mark
[DE/DE]; Mommsenstrasse 18, 40699 Erkrath (DE).
ESSER, Sybille [DE/DE]; Sedentalerstrasse 20,
40699 Erkrath (DE). RUEDIGER, Manfred [DE/DE];
Kitzbuehler Weg 34, 40789 Monheim (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: F. HOFFMANN-LA ROCHE
AG; Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel (CH).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD,
GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen

Recherchenberichts: 26. August 2004

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: TRANSPLANTABLE CELL WITH IMMUNE MODULATOR

(54) Bezeichnung: TRANSPLANTIERBARE ZELLE MIT IMMUNMODULATOR

(57) Abstract: The invention relates to a human or animal non-totipotent cell which contains at least one nucleic acid which codes for at least one immune modulator by controlling a gene switch molecule which is adjusted by adding an active substance. The invention also relates to the production and use thereof in transplants in order to inhibit transplant rejection and also for the prophylaxis and/or therapy of diseases resulting from a transplant and/or auto immune diseases.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine humane oder tierische nicht-totipotente Zelle, die mindestens eine Nukleinsäure enthält, welche für mindestens einen Immunmodulator unter der Kontrolle eines durch Zugabe einer Wirksubstanz regulierbaren Genschaltermoleküls kodiert sowie ihre Herstellung und Verwendung zur Transplantation, zur Inhibierung einer Transplantationsabstoßungsreaktion sowie zur Prophylaxe und/oder Therapie von Transplantationsfolge- und/oder Autoimmunkrankheiten.

WO 2004/035787 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/CH00/00665

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

| | | | | | |
|-------|-----------|------------|-----------|-----------|------------|
| IPC 7 | C12N15/12 | C12N15/62 | C12N15/63 | C12N5/06 | C12N5/08 |
| | C12N5/10 | A01K67/027 | A61K35/34 | A61K35/39 | C07K14/705 |
| | C07K14/54 | C07K16/46 | C07K16/00 | | |

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-------------------------------|
| X | US 5 912 411 A (BUJARD HERMANN ET AL) 15 June 1999 (1999-06-15) | 1-8, 11-34 |
| Y | column 37 -column 42 --- | 9,10 |
| X | US 5 733 727 A (FIELD LOREN J) 31 March 1998 (1998-03-31) | 1,2,4,6, 8,11-13, 15-24 |
| X | example 5 --- | 3,5 |
| X | KOH GOU YOUNG ET AL: "Targeted expression of transforming growth factor-beta-1 in intracardiac grafts promotes vascular endothelial cell DNA synthesis" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 95, no. 1, 1995, pages 114-121, XP008031081 ISSN: 0021-9738 | 1,2,4,6, 8,11-13, 15-24 |
| X | the whole document --- -/-- | 5 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 May 2004

Date of mailing of the international search report

22/06/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Madruga, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/CH 00/00665

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| Y | WO 01/87330 A (LACRAZ SYLVIE FERRARI;KIM YON SU; ZHENG XIN XIAO; MASLINSKI WLODZIMIER) 22 November 2001 (2001-11-22) cited in the application page 1; claims page 3, line 13 -page 11, line 10 page 13, line 1 -page 18, line 6 page 30, line 10 -page 32, line 18 | 9,10 |
| A | FERRARI-LACRAZ S ET AL: "An antagonist IL-15/Fc protein prevents costimulation blockade-resistant rejection" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, vol. 167, no. 6, 15 September 2001 (2001-09-15), pages 3478-3485, XP002185137 ISSN: 0022-1767 cited in the application the whole document | 9,10 |
| A | WO 01/71006 A (FRANZ WOLFGANG M) 27 September 2001 (2001-09-27) page 5; claims; figure 1 | |
| A | WO 01/40494 A (COUTURE CLEMENT ;JAALOUK DIANA E (CA); MADER SYLVIE (CA); CT FOR T) 7 June 2001 (2001-06-07) claims | |
| A | WO 00/12741 A (MEHTALI MAJID ;SORG GUSS TANIA (FR); TRANSGENE SA (FR)) 9 March 2000 (2000-03-09) example 10 | |
| A | STROM T B ET AL: "Allogeneic stem cells, clinical transplantation, and the origins of regenerative medicine." TRANSPLANTATION PROCEEDINGS. UNITED STATES 2001 NOV-DEC, vol. 33, no. 7-8, November 2001 (2001-11), pages 3044-3049, XP002282652 ISSN: 0041-1345 the whole document | |

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 20, 21, 28, 29, 30, 33 and 34 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the stated effects of the compound or composition.

2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

see additional sheet

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box I.2

The current claims 1 to 34 relate to an inordinately large number of possible compounds, products, devices and methods in connection with "immune modulators". In fact the number of alternatives, variables, possible permutations and/or restrictions is such that the claims are too unclear (and/or too broadly worded) (PCT Article 6) to allow a meaningful search to be carried out. The search was therefore directed to the parts of the claims that can be considered clear and concise, namely the immune modulators specified in the examples, on pages 9 and 10 of the description and in the claims.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established cannot normally be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subject matter that has not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/CH03/00665

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 5912411 | A | 15-06-1999 | US 5789156 A | 04-08-1998 |
| | | | US 5654168 A | 05-08-1997 |
| | | | US 5650298 A | 22-07-1997 |
| | | | US 5464758 A | 07-11-1995 |
| | | | US 6242667 B1 | 05-06-2001 |
| | | | US 2002152489 A1 | 17-10-2002 |
| | | | AU 3092395 A | 25-01-1996 |
| | | | AU 4456699 A | 25-11-1999 |
| | | | CA 2193122 A1 | 18-01-1996 |
| | | | CN 1167504 A | 10-12-1997 |
| | | | DE 804565 T1 | 04-05-2000 |
| | | | EP 1092771 A2 | 18-04-2001 |
| | | | EP 0804565 A1 | 05-11-1997 |
| | | | ES 2139552 T1 | 16-02-2000 |
| | | | FI 965287 A | 28-02-1997 |
| | | | JP 11506901 T | 22-06-1999 |
| | | | NO 965623 A | 28-02-1997 |
| | | | WO 9601313 A1 | 18-01-1996 |
| | | | US 6136954 A | 24-10-2000 |
| | | | US 2004003417 A1 | 01-01-2004 |
| | | | US 6004941 A | 21-12-1999 |
| | | | US 5589362 A | 31-12-1996 |
| | | | US 5814618 A | 29-09-1998 |
| | | | US 5866755 A | 02-02-1999 |
| | | | US 6271348 B1 | 07-08-2001 |
| | | | US 2003022315 A1 | 30-01-2003 |
| | | | US 6252136 B1 | 26-06-2001 |
| | | | US 2002077307 A1 | 20-06-2002 |
| | | | US 5888981 A | 30-03-1999 |
| | | | US 5859310 A | 12-01-1999 |
| | | | US 2002086426 A1 | 04-07-2002 |
| | | | US 2002152487 A1 | 17-10-2002 |
| | | | US 5922927 A | 13-07-1999 |
| | | | AU 684524 B2 | 18-12-1997 |
| | | | AU 7108194 A | 03-01-1995 |
| | | | CA 2165162 A1 | 22-12-1994 |
| | | | DE 705334 T1 | 30-12-1999 |
| | | | EP 0705334 A1 | 10-04-1996 |
| | | | ES 2140359 T1 | 01-03-2000 |
| | | | JP 9500526 T | 21-01-1997 |
| | | | WO 9429442 A2 | 22-12-1994 |
| US 5733727 | A | 31-03-1998 | US 5602301 A | 11-02-1997 |
| | | | US 6399300 B1 | 04-06-2002 |
| | | | US RE37978 E1 | 04-02-2003 |
| | | | US 2001038837 A1 | 08-11-2001 |
| | | | US 2002061295 A1 | 23-05-2002 |
| | | | US 6015671 A | 18-01-2000 |
| | | | AU 688427 B2 | 12-03-1998 |
| | | | AU 1097695 A | 06-06-1995 |
| | | | AU 697666 B2 | 15-10-1998 |
| | | | AU 5214198 A | 19-03-1998 |
| | | | CA 2174860 A1 | 26-05-1995 |
| | | | EP 0729506 A1 | 04-09-1996 |
| | | | JP 9505471 T | 03-06-1997 |
| | | | WO 9514079 A1 | 26-05-1995 |
| WO 0187330 | A | 22-11-2001 | AU 6158501 A | 26-11-2001 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/CH/00665

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 0187330 | A | | CA 2408691 A1 | 22-11-2001 |
| | | | CN 1441675 T | 10-09-2003 |
| | | | EP 1284747 A2 | 26-02-2003 |
| | | | JP 2003533488 T | 11-11-2003 |
| | | | WO 0187330 A2 | 22-11-2001 |
| | | | US 2002128436 A1 | 12-09-2002 |
| WO 0171006 | A | 27-09-2001 | DE 10014690 A1 | 18-10-2001 |
| | | | AU 5622201 A | 03-10-2001 |
| | | | WO 0171006 A2 | 27-09-2001 |
| | | | EP 1218526 A2 | 03-07-2002 |
| | | | US 2003003533 A1 | 02-01-2003 |
| WO 0140494 | A | 07-06-2001 | AU 1685201 A | 12-06-2001 |
| | | | WO 0140494 A1 | 07-06-2001 |
| | | | CA 2392941 A1 | 07-06-2001 |
| | | | EP 1234047 A1 | 28-08-2002 |
| | | | US 2003031650 A1 | 13-02-2003 |
| WO 0012741 | A | 09-03-2000 | FR 2782732 A1 | 03-03-2000 |
| | | | AU 5426299 A | 21-03-2000 |
| | | | CA 2341775 A1 | 09-03-2000 |
| | | | EP 1108051 A2 | 20-06-2001 |
| | | | WO 0012741 A2 | 09-03-2000 |
| | | | JP 2002523106 T | 30-07-2002 |

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Internationales Patentzeichen
PCT/CH/00665

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/12 C12N15/62 C12N15/63 C12N5/06 C12N5/08
C12N5/10 A01K67/027 A61K35/34 A61K35/39 C07K14/705
C07K14/54 C07K16/46 C07K16/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|-------------------------------|
| X | US 5 912 411 A (BUJARD HERMANN ET AL) 15. Juni 1999 (1999-06-15) | 1-8, 11-34 |
| Y | Spalte 37 -Spalte 42 | 9,10 |
| X | US 5 733 727 A (FIELD LOREN J) 31. März 1998 (1998-03-31) | 1,2,4,6, 8,11-13, 15-24 |
| X | Beispiel 5 | 3,5 |
| X | KOH GOU YOUNG ET AL: "Targeted expression of transforming growth factor-beta-1 in intracardiac grafts promotes vascular endothelial cell DNA synthesis" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, Bd. 95, Nr. 1, 1995, Seiten 114-121, XP008031081 ISSN: 0021-9738 | 1,2,4,6, 8,11-13, 15-24 |
| X | das ganze Dokument | 5 |



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. Mai 2004

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

22/06/2004

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Madrugá, J

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| Y | <p>WO 01/87330 A (LACRAZ SYLVIE FERRARI;KIM YON SU; ZHENG XIN XIAO; MASLINSKI WLODZIMIER) 22. November 2001 (2001-11-22) in der Anmeldung erwähnt Seite 1; Ansprüche Seite 3, Zeile 13 -Seite 11, Zeile 10 Seite 13, Zeile 1 -Seite 18, Zeile 6 Seite 30, Zeile 10 -Seite 32, Zeile 18</p> | 9,10 |
| A | <p>FERRARI-LACRAZ S ET AL: "An antagonist IL-15/Fc protein prevents costimulation blockade-resistant rejection" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, Bd. 167, Nr. 6, 15. September 2001 (2001-09-15), Seiten 3478-3485, XP002185137 ISSN: 0022-1767 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> | 9,10 |
| A | <p>WO 01/71006 A (FRANZ WOLFGANG M) 27. September 2001 (2001-09-27) Seite 5; Ansprüche; Abbildung 1</p> | |
| A | <p>WO 01/40494 A (COUTURE CLEMENT ;JAALOUK DIANA E (CA); MADER SYLVIE (CA); CT FOR T) 7. Juni 2001 (2001-06-07) Ansprüche</p> | |
| A | <p>WO 00/12741 A (MEHTALI MAJID ;SORG GUSS TANIA (FR); TRANSGENE SA (FR)) 9. März 2000 (2000-03-09) Beispiel 10</p> | |
| A | <p>STROM T B ET AL: "Allogeneic stem cells, clinical transplantation, and the origins of regenerative medicine." TRANSPLANTATION PROCEEDINGS. UNITED STATES 2001 NOV-DEC, Bd. 33, Nr. 7-8, November 2001 (2001-11), Seiten 3044-3049, XP002282652 ISSN: 0041-1345 das ganze Dokument</p> | |

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. —
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Obwohl die Ansprüche 20,21,28,29,30,33,34 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☒ Ansprüche Nr. —
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr. —
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. —
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt: —

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Die geltenden Patentansprüche 1-34 beziehen sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Verbindungen, Produkte, Vorrichtungen oder Verfahren, nämlich im Bezug auf "Immunmodulator". In der Tat umfassen sie so viele Wahlmöglichkeiten, Veränderliche, mögliche Permutationen und/oder Einschränkungen, daß sie im Sinne von Art. 6 PCT in einem solchen Maße unklar (und/oder zu weitläufig gefasst) erscheinen, als daß sie eine sinnvolle Recherche ermöglichen. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, die als klar und knapp gefaßt gelten können, nämlich die Immunmodulatoren wie diese in den Ausführungsbeispielen, wie in der Beschreibung auf Seite 9-10 und wie in die Ansprüche angegeben sind.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur Patentfamilie gehören

Internationales Patentzeichen
PCT/CH 00665

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| US 5912411 A | 15-06-1999 | US 5789156 A | 04-08-1998 |
| | | US 5654168 A | 05-08-1997 |
| | | US 5650298 A | 22-07-1997 |
| | | US 5464758 A | 07-11-1995 |
| | | US 6242667 B1 | 05-06-2001 |
| | | US 2002152489 A1 | 17-10-2002 |
| | | AU 3092395 A | 25-01-1996 |
| | | AU 4456699 A | 25-11-1999 |
| | | CA 2193122 A1 | 18-01-1996 |
| | | CN 1167504 A | 10-12-1997 |
| | | DE 804565 T1 | 04-05-2000 |
| | | EP 1092771 A2 | 18-04-2001 |
| | | EP 0804565 A1 | 05-11-1997 |
| | | ES 2139552 T1 | 16-02-2000 |
| | | FI 965287 A | 28-02-1997 |
| | | JP 11506901 T | 22-06-1999 |
| | | NO 965623 A | 28-02-1997 |
| | | WO 9601313 A1 | 18-01-1996 |
| | | US 6136954 A | 24-10-2000 |
| | | US 2004003417 A1 | 01-01-2004 |
| | | US 6004941 A | 21-12-1999 |
| | | US 5589362 A | 31-12-1996 |
| | | US 5814618 A | 29-09-1998 |
| | | US 5866755 A | 02-02-1999 |
| | | US 6271348 B1 | 07-08-2001 |
| | | US 2003022315 A1 | 30-01-2003 |
| | | US 6252136 B1 | 26-06-2001 |
| | | US 2002077307 A1 | 20-06-2002 |
| | | US 5888981 A | 30-03-1999 |
| | | US 5859310 A | 12-01-1999 |
| | | US 2002086426 A1 | 04-07-2002 |
| | | US 2002152487 A1 | 17-10-2002 |
| | | US 5922927 A | 13-07-1999 |
| | | AU 684524 B2 | 18-12-1997 |
| | | AU 7108194 A | 03-01-1995 |
| | | CA 2165162 A1 | 22-12-1994 |
| | | DE 705334 T1 | 30-12-1999 |
| | | EP 0705334 A1 | 10-04-1996 |
| | | ES 2140359 T1 | 01-03-2000 |
| | | JP 9500526 T | 21-01-1997 |
| | | WO 9429442 A2 | 22-12-1994 |
| US 5733727 A | 31-03-1998 | US 5602301 A | 11-02-1997 |
| | | US 6399300 B1 | 04-06-2002 |
| | | US RE37978 E1 | 04-02-2003 |
| | | US 2001038837 A1 | 08-11-2001 |
| | | US 2002061295 A1 | 23-05-2002 |
| | | US 6015671 A | 18-01-2000 |
| | | AU 688427 B2 | 12-03-1998 |
| | | AU 1097695 A | 06-06-1995 |
| | | AU 697666 B2 | 15-10-1998 |
| | | AU 5214198 A | 19-03-1998 |
| | | CA 2174860 A1 | 26-05-1995 |
| | | EP 0729506 A1 | 04-09-1996 |
| | | JP 9505471 T | 03-06-1997 |
| | | WO 9514079 A1 | 26-05-1995 |
| WO 0187330 A | 22-11-2001 | AU 6158501 A | 26-11-2001 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Verzeichnis

PCT/CH 03/00665

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| WO 0187330 A | | CA 2408691 A1 | 22-11-2001 |
| | | CN 1441675 T | 10-09-2003 |
| | | EP 1284747 A2 | 26-02-2003 |
| | | JP 2003533488 T | 11-11-2003 |
| | | WO 0187330 A2 | 22-11-2001 |
| | | US 2002128436 A1 | 12-09-2002 |
| WO 0171006 A | 27-09-2001 | DE 10014690 A1 | 18-10-2001 |
| | | AU 5622201 A | 03-10-2001 |
| | | WO 0171006 A2 | 27-09-2001 |
| | | EP 1218526 A2 | 03-07-2002 |
| | | US 2003003533 A1 | 02-01-2003 |
| WO 0140494 A | 07-06-2001 | AU 1685201 A | 12-06-2001 |
| | | WO 0140494 A1 | 07-06-2001 |
| | | CA 2392941 A1 | 07-06-2001 |
| | | EP 1234047 A1 | 28-08-2002 |
| | | US 2003031650 A1 | 13-02-2003 |
| WO 0012741 A | 09-03-2000 | FR 2782732 A1 | 03-03-2000 |
| | | AU 5426299 A | 21-03-2000 |
| | | CA 2341775 A1 | 09-03-2000 |
| | | EP 1108051 A2 | 20-06-2001 |
| | | WO 0012741 A2 | 09-03-2000 |
| | | JP 2002523106 T | 30-07-2002 |